IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER DURCH TETRACHLORMETHAN VERURSACHTEN LEBERSCHÄDIGUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

BERNHARD LINK
aus Nagold

~~1985~~
1984

UNIV.
ILLINOIS
INST.

IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER DURCH TETRACHLORMETHAN VERURSACHTEN LEBERSCHÄDIGUNG

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

BERNHARD LINK
aus Nagold

1985

Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.1984
Dekan: Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter: Prof. Dr.Dr.h.c. H. Remmer
2. Berichterstatter: Prof.Dr. H. Hagenmaier

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1979 bis Dezember 1983 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. rer. nat. Hartmut Frank unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Remmer durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas und für die Betreuung der Arbeit, für zahlreiche Anregungen und wertvolle Diskussionen danke ich Herrn Dr. H. Frank.

Für die Überlassung des Arbeitsplatzes, das Interesse an der Arbeit und für sein Verständnis und Entgegenkommen danke ich Herrn Prof. Dr. H. Remmer.

Ein wesentlicher Beitrag zu dieser Arbeit ging aus den massenspektrometrischen Untersuchungen hervor, die von Herrn Diplom-Ingenieur (FH) D. Thiel durchgeführt wurden; ihm gilt daher mein besonderer Dank. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und stetige Hilfsbereitschaft danken.

Diese Arbeit wurde ermöglicht durch finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums der Evangelischen Studienstiftung Villigst, durch Darlehen nach dem Graduierten-Förderungs-Gesetz und durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Inhaltsverzeichnis:

1.	Einleitung	1
1.1.	Eigenschaften und Verwendung von Tetrachlormethan	2
1.2.	Toxizität von Tetrachlormethan	3
1.3.	Metabolismus von Tetrachlormethan	5
1.4.	Mechanismus der Tetrachlormethan-abhängigen Schädigungsprozesse	6
1.4.1.	Lipidperoxidations-These	7
1.4.1.1.	Modell der durch Eisenionen und NADPH induzierten Lipidperoxidation in Lebermikrosomen	8
1.4.1.2.	Hämolysemodell der Lipidperoxidation	11
1.4.1.3.	Lipidperoxidation als Ursache der Tetrachlormethan-Toxizität	11
1.4.2.	Kovalente Bindung von Trichlormethyl-Radikalen als Ursache der Tetrachlormethan-Toxizität	14
1.5.	Gegenstand der Arbeit	15
2.	Material und Methoden	18
2.1.	Chemikalien und Biochemikalien	18
2.1.1.	Chemikalien	18
2.1.2.	Radioaktiv markiertes Tetrachlormethan	19
2.1.3.	Enzyme und Proteine	19
2.1.4.	Materialien für die Chromatographie	20
2.2.	Synthese und Isolierung von 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure	21
2.3.	Versuche mit Erythrozyten	24
2.3.1.	Erythrozyten-Präparation	24
2.3.2.	Inkubation der Erythrozyten mit Arachidonsäure bzw. 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure	25
2.3.3.	Untersuchung der osmotischen Fragilität der inkubierten Erythrozyten	25
2.3.4.	Methämoglobin - Bestimmung	26

2.4. Versuche mit Rattenlebermikrosomen 27
2.4.1. Mikrosomenpräparation 27
2.4.1.1. Tiere 27
2.4.1.2. Vorbehandlung der Tiere 27
2.4.1.3. Gewinnung der Mikrosomen 28
2.4.2. Bestimmung mikrosomaler Proteine 29
2.4.2.1. Proteinbestimmung nach Lowry 29
2.4.2.2. Bestimmung von Cytochrom P-450 29
2.4.2.3. Bestimmung von Cytochrom P-420 30
2.4.2.4. Bestimmung von Cytochrom b_5 30
2.4.3. Untersuchung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung . 31
2.4.3.1. Inkubation mit Ethylmorphin 32
2.4.3.2. Formaldehydbestimmung 33
2.4.3.3. Kinetische Analyse der Meßergebnisse 34
2.4.4. Inkubation von Mikrosomen mit 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure bzw. ihrer thermischen Zerfallsprodukte 35
2.4.5. Geschlossenes Inkubationssystem für Mikrosomen zur Dampfraum-Analyse von Alkanen und chlorierten Kohlenwasserstoffen 36
2.4.5.1. Automatisches Probengebersystem zur Gasprobenentnahme für die Gaschromatographie 38
2.4.5.2. Gaschromatographische Analyse von Trichlor- und Tetrachlormethan 41
2.4.5.3. Gaschromatographische Analyse von Alkanen 42
2.4.6. Inkubation von Mikrosomen mit Tetrachlormethan unter Stickstoff 43
2.4.6.1. Inkubation im geschlossenen System 43
2.4.6.1.1. Berechnung der Tetrachlormethan-Metabolisierung 44
2.4.6.1.2. Berechnung der Trichlormethan-Bildung 46
2.4.6.1.3. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten und des Entnahmevolumens 46
2.4.6.1.4. Berechnung der Alkan-Bildung 48
2.4.6.2. Inkubation mit radioaktivem Tetrachlormethan 48
2.4.7. Inkubation von Mikrosomen unter peroxidierenden Bedingungen 50
2.4.7.1. Inkubation im geschlossenen System 51

2.4.8. Bestimmung von Malonaldehyd bzw. von Thiobarbitursäure-positiven Verbindungen 51
2.5. Analyse mikrosomaler Lipide 53
2.5.1. Lipidextraktion aus Mikrosomen 53
2.5.2. Analyse der Phospholipide 53
2.5.2.1. Dünnschichtchromatographische Phospholipidtrennung 54
2.5.2.1.1. Detektion durch Veraschung 54
2.5.2.1.2. Detektion mit Rhodamin B 55
2.5.2.1.3. Detektion von radioaktiv markierten Lipiden 55
2.5.2.1.4. Elution von Phospholipiden aus den DC-Platten 55
2.5.2.2. Säulenchromatographische Phospholipid-Trennung 55
2.5.2.3. Phosphatbestimmung in den Phospholipiden 56
2.5.3. Fettsäure-Analyse 58
2.5.3.1. Synthese von Fettsäuremethylestern 58
2.5.3.1.1. Veresterung mit 14-prozentiger Bortrifluorid-Lösung in Methanol 58
2.5.3.1.2. Veresterung mit Diazomethan 59
2.5.3.1.3. Katalytische Hydrierung von Fettsäuremethylestern 60
2.5.3.2. Chromatographische Verfahren 60
2.5.3.2.1. Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester 60
2.5.3.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Fettsäuremethylestern 60
2.5.3.2.3. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester mit dem Flammenionisationsdetektor (FID) 63
2.5.3.2.4. Gaschromatographische Analysen unter Verwendung des Elektroneneinfangdetektors 66
2.5.3.3. Analyse der Additionsverbindungen zwischen Fettsäure-methylestern und Tetrachlormethan-Metaboliten durch Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie ... 68
2.5.3.3.1. Massenspekrometrie bei Elektronenstoßionisation 69
2.5.3.3.2. Chemische Ionisation mit Isobutan als Reaktantgas 69
2.5.3.3.3. Chemische Ionisation mit Ammoniak als Reaktantgas 70
2.5.3.3.4. Negative chemische Ionisation 71
2.5.3.3.5. Synthese von Trichlormethylstearinsäuremethylester als Vergleichssubstanz für die GC/MS-Analyse 72
2.5.3.3.6. Qantitative Bestimmung trichlormethylierter Fettsäuremethylester durch GC/MS 72

2.6. Inkubation von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A_2 74
2.6.1. Inkubation mit Phospholipase A_2 aus Schlangengift 74
2.6.2. Inkubation mit Phospholipase A_2 aus Schweine-Pankreas 75
2.7. Bestimmung der Radioaktivität 76

3. Ergebnisse und Diskussion 77

3.1. Wirkung von Arachidonsäure und ihrem Hydroperoxid auf Erythrozyten 77
3.1.1. Osmotische Fragilität 77
3.1.1.1. Kontrollversuche mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen 77
3.1.1.2. Inkubation mit Arachidonsäure 77
3.1.1.3. Inkubation mit 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure 78
3.1.2. Methämoglobinbildung durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure 80
3.1.3. Rolle von Fettsäurehydroperoxiden bei der Hämolyse 83
3.2. Wirkung von 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure auf mikrosomale Cytochrome 86
3.2.1. Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung 86
3.2.1.1. Kinetik der ungehemmten mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung 86
3.2.1.2. Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung durch Arachidonsäure 87
3.2.1.3. Hemmung durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure 90
3.2.2. Zerstörung von Cytochrom P-450 durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure 94
3.2.3. Zerstörung von Cytochrom b_5 96
3.2.4. Wirkung von thermischen Zerfallsprodukten der 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure auf mikrosomale Cytochrome 97
3.2.5. Folgerungen 99
3.3. Mikrosomale Lipidperoxidation durch NADPH in Gegenwart von Eisenionen und ADP 102
3.3.1. Peroxidation ungesättigter Fettsäuren und Zerstörung von Cytochrom P-450 102
3.3.2. Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung durch mikrosomale Lipidperoxidation 106

3.3.3. Einfluß der Lipidperoxidation auf die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide 108

3.4. Mikrosomale Metabolisierung von Tetrachlormethan unter Stickstoff in Gegenwart von NADPH 111

3.4.1. Gleichgewichtseinstellung von Tri- und Tetrachlormethan im geschlossenen System 111

3.4.2. Metabolisierung von Tetrachlormethan und Trichlormethan-Bildung 114

3.4.3. Einfluß der Tetrachlormethan-Metabolisierung auf den Gehalt von Cytochrom P-450 und auf die Fettsäuren in Mikrosomen 116

3.5. Kovalente Bindung von radioaktiv markierten Tetrachlormethan-Metaboliten an mikrosomale Lipide 122

3.5.1. Inkubation von Mikrosomen mit radioaktivem Tetrachlormethan unter Stickstoff 122

3.5.2. Phospholipidzusammensetzung des Lipidextrakts 124

3.5.3. Synthese der Fettsäuremethylester aus dem Lipidextrakt ... 126

3.5.4. Chromatographische Analyse des Fettsäuremethylester-Extrakts 126

3.5.4.1. Dünnschichtchromatographische Trennung 126

3.5.4.2. Trennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie 129

3.5.4.3. Gaschromatographische Trennung 132

3.5.4.3.1. Detektion mit dem Flammenionisationsdetektor 132

3.5.4.3.2. Detektion mit dem Elektroneneinfangdetektor 132

3.5.5. Strukturaufklärung kovalent modifizierter Fettsäure-methylester durch Gaschromatoraphie/Massenspektrometrie .. 136

3.5.5.1. Nachweis chlorhaltiger Produkte durch negative chemische Ionisation 136

3.5.5.2. Strukturaufklärung der chlorhaltigen Fettsäure-methylesteraddukte nach katalytischer Hydrierung 138

3.5.5.2.1. GC/MS des hydrierten Hexanextrakts mit Elektronenstoß-Ionisation 139

3.5.5.2.2. GC/MS des hydrierten Hexanextrakts bei chemischer Ionisation mit Isobutan 141

3.5.5.3. Strukturaufklärung der chlorhaltigen Verbindungen aus dem Hexanextrakt ohne vorherige katalytische Hydrierung .. 144

3.5.5.3.1. Gaschromatographie/Massenspektrometrie bei chemischer Ionisation mit Isobutan 144
3.5.5.3.2. Gaschromatographie/Massenspektrometrie bei chemischer Ionisation mit Ammoniak 148
3.5.5.4. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung der durch HPLC getrennten Fraktionen des Hexanextrakts ... 152
3.5.5.5. Quantifizierung der gefundenen Trichlormethyl-Fettsäuremethylester durch GC/MS 155
3.5.6. Mechanismus der kovalenten Bindung von Tetrachlormethan-Metaboliten an Lipide 158

3.6. Hydrolyse kovalent modifizierter Phospholipide durch Phospholipase A_2 161
3.6.1. Hydrolyse von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A_2 aus Schlangengift (Naja naja) 161
3.6.2. Hydrolyse von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas 163

4. Schlußfolgerungen 170

4.1. Zur Lipidperoxidations-Hypothese 170
4.2. Modell der anaeroben Tetrachlormethan-Metabolisierung 173
4.3. Mechanismus der kovalenten Bindung von Tetrachlormethan-Metaboliten 175
4.4. Bedeutung kovalent modifizierter Lipide für die Toxizität von Tetrachlormethan 181

5. Zusammenfassung 185

6. Literaturverzeichnis 187

Verzeichnis der Abkürzungen

ADP:	Adenosin-5'-diphosphorsäure
BHT:	2,6-Di-t-butyl-p-cresol
BzOOBz:	Benzoylperoxid
CI:	chemische Ionisation
Ch:	Cholesterin
Ch.E.:	Cholesterinester
DC:	Dünnschichtchromatographie
ECD:	Elektroneneinfangdetektor
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EI:	Elektronenstoß-Ionisation
FFAP:	Free Fatty Acid Phase (stationäre Phase für die GC)
FID:	Flammenionisationsdetektor
fr.FS:	freie Fettsäuren
FSME:	Fettsäuremethylester
GC:	Gaschromatographie
GC/MS:	Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie
GSH:	Glutathion
HbO_2:	Oxyhämoglobin
HPETE:	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPLC:	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
K_m:	Michaelis-Konstante
LPC:	Lysophosphatidylcholin
LPE:	Lysophosphatidylethanolamin
MDA:	Thiobarbitursäure-reaktives Material ("Malonaldehyd")
ME:	Methylester
MetHb:	Methämoglobin
MS:	Massenspektrometrie
NAD(H):	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP(H):	ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)
NCI:	negative chemische Ionisation
PC:	Phosphatidylcholin
PE:	Phosphatidylethanolamin
PI:	Phosphatidylinosit
POPOP:	2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol)
PPO:	2,5-Diphenyloxazol
SDS:	Natriumdodecylsulfat

SM:	Sphingomyelin
R_f:	relative Wanderungsgeschwindigkeit
RT:	Retentionszeit
Tris:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm:	Umdrehungen pro Minute
V_{max}:	enzymatische Maximalgeschwindigkeit
vpm:	Volumenanteile pro eine Million Volumenteile
v/v:	Volumenteile

Abkürzungen der Fettsäuren

16:0	Palmitinsäure
18:0	Stearinsäure
18:1c	Ölsäure
18:1t	trans-Vaccensäure
18:2	Linolsäure
18:3	Linolensäure
20:4	Arachidonsäure
22:6	Docosahexaensäure

We, as chemists, can contribute to developing a better world. Our primary duty now is to work to help educate our fellow citizens. We are facing the unprecedented threat of extinction of the human race in a nuclear war, and we must all join in taking unprecedented actions to prevent this annihilation and to achieve the goal of the abolition of war. We must do our part to see to it that there is a world of tomorrow.

(Wir Chemiker können dazu beitragen, eine bessere Welt zu schaffen. Unsere Pflicht besteht nun in erster Linie darin, unsere Arbeit zu tun, um an der Aufklärung unserer Mitbürger mitzuwirken. Zum ersten Mal stehen wir der Gefahr der Auslöschung der Menschheit in einem Atomkrieg gegenüber und wir müssen alle gemeinsam völlig neue Schritte unternehmen, um diese Vernichtung zu verhindern und das Ziel, nämlich die Abschaffung des Krieges, zu erreichen. Wir müssen unseren Teil leisten, wenn es darum geht dafür zu sorgen, daß es eine Welt von morgen gibt.)

Linus C. Pauling,
Nobel-Preisträger für Chemie und Träger des Friedens-Nobel-Preises,
am 9. April 1983 in einer Rede vor der American Chemical Society
anläßlich der Verleihung der Priestley-Medaille.

1. Einleitung

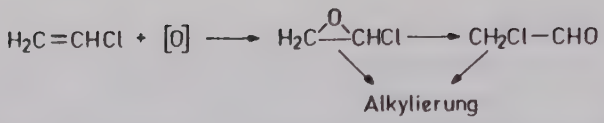
In den letzten Jahrzehnten wurden große Mengen chlorierter Kohlenwasserstoffe produziert, 1973 etwa 40 Mio. Tonnen (#98); die Produktion nahm seither weiter zu. Neben ihrer Verwendung als Ausgangsstoffe für die Synthese von Fluorkohlenwasserstoffen und die Produktion von Kunststoffen werden bzw. wurden chlorierte Kohlenwasserstoffe als Insektizide, Herbizide, Arzneimittel, zu Narkosezwecken und als Kühlmittel eingesetzt, große Bedeutung haben sie auch als organische Lösungsmittel erlangt.

Da durch den universellen Einsatz chlorierter Kohlenwasserstoffe und ihrer meist hohen Persistenz immer mehr Menschen diesen Verbindungen ausgesetzt sind, gewinnt die Untersuchung der Toxizität dieser Stoffe zunehmend an Bedeutung. In der Regel handelt es sich bei den industriell und gewerblich verwendeten chlorierten Kohlenwasserstoffen um relativ stabile Verbindungen, die ihre Toxizität erst dadurch entfalten, daß sie im Organismus zu reaktiven Zwischenverbindungen umgewandelt werden.

Verantwortlich für die Metabolisierung von Fremdstoffen im Organismus ist in erster Linie ein Enzymsystem, das vor allem in der Leber, aber auch in der Niere, der Lunge und im Dünndarm vorkommt und dort im endoplasmatischen Retikulum der Zellen lokalisiert ist. Allgemein hat dieses Enzymsystem die Funktion, lipophile Substanzen - sowohl körpereigene als auch körperfremde - in hydrophile Stoffe umzuwandeln und dadurch ausscheidungsfähig zu machen. Es besteht aus membrangebundenen Monooxygenasen, die nur geringe Spezifität aufweisen und daher unterschiedlichste Stoffe umsetzen können. Im allgemeinen werden die Substrate dabei oxidiert, wobei aus molekularem Sauerstoff ein Atom auf das Substrat übertragen wird, das andere Sauerstoffatom wird mit Hilfe von Reduktionsäquivalenten aus NADPH, oder auch NADH, zu Wasser reduziert (Übersichtsartikel zu diesem Thema siehe #188):

$$RH + O_2 + NAD(P)H + H^+ \longrightarrow ROH + H_2O + NAD(P)^+$$

Chlorierte Kohlenwasserstoffe können nach dem gleichen Mechanismus oxidiert werden. Dabei treten unter Umständen reaktive Zwischenverbindungen auf, die sich durch ihre elektrophilen Eigenschaften auszeichnen und daher alkylierend wirken. Als Beispiel dafür seien die Epoxide genannt, die bei der Oxidation von chlorierten Ethenen entstehen können (#18;#62):



Eine andere Möglichkeit der Metabolisierung chlorierter Kohlenwasserstoffe besteht in der direkten Übertragung von Elektronen, ohne die Beteiligung von Sauerstoff. Insbesondere bei höher halogenierten Kohlenwasserstoffen, bei denen ein oxidativer Abbau nur beschränkt möglich ist, wurde dieser Metabolisierungsweg nachgewiesen, so z.B. für DDT (#40;#183), Halothan (#105;#127;#174;#176) und Hexachlorethan (#106). Als Zwischenverbindungen entstehen bei der Übertragung eines Elektrons zunächst Radikale, die wegen ihrer hohen Reaktivität als primäre Ursache für die Toxizität dieser Substanzen angesehen werden (#2):

$$R{-}X + e^- \longrightarrow R\cdot + X^-$$

Am besten untersucht ist dieser Mechanismus am Beispiel des Tetrachlormethans. Der Untersuchung von Metabolismus und Toxizität dieser Verbindung kommt insofern für den reduktiven Weg der Fremdstoffmetabolisierung Modellcharakter zu.

1.1. Eigenschaften und Verwendung von Tetrachlormethan

Physikalische Daten (#69):
Tetrachlormethan (Tetrachlorkohlenstoff, CCl_4) ist eine farblose, leicht flüchtige, aber unbrennbare Flüssigkeit.
Siedepunkt 76,7°C,
Dichte bei 25°C: 1,585 g/cm^3,
Molekulargewicht 153,8

Als eine der am längsten bekannten halogenierten aliphatischen Verbindungen wurde es industriell und gewerblich als Lösungs-, Reinigungs- und Entfettungsmittel verwendet, in der Medizin diente es zeitweise als Narkose- und Wurmmittel, wegen seiner Unbrennbarkeit wurde es auch lange Zeit als Feuerlöschmittel benutzt. Aufgrund seiner Toxizität wurde es in diesen Bereichen weitgehend durch andere Stoffe ersetzt, heute dient Tetrachlormethan in erster Linie als Ausgangsprodukt für die Synthese von Fluorkohlenwasserstoffen und Pestiziden. Die Jahresproduktion lag 1973 weltweit bei ca. 1 Mio. Tonnen (#15).

1.2. Toxizität von Tetrachlormethan

Im Laufe seiner gewerblichen und medizinischen Verwendung wurde die Toxizität von Tetrachlormethan schon früh erkannt und ist vergleichsweise gut dokumentiert (Übersichtsliteratur dazu siehe #15;#38;#133).

Das klinische Bild einer akuten CCl_4-Vergiftung ist zunächst geprägt durch seine Wirkung auf das zentrale Nervensystem; in schweren Fällen können Atemstillstand und Herzrythmusstörungen akut zum Tod führen. Innerhalb weniger Tage nach der Intoxikation treten schwere Leberschäden (zentrilobuläre Nekrosen mit Fettinfiltration), ferner Schädigungen der Nieren (Degeneration der Tubuli) und der Lungen (Ödembildung, Blutungen, Bronchopneumonie) auf, die tödlich enden können. In weniger schweren Fällen sind die hepato-renalen Schäden reversibel, doch wird ein Zusammenhang zwischen akuter Leberschädigung und dem Auftreten von Lebertumoren nach mehreren Jahren nicht ausgeschlossen (#172). Im Tierexperiment wurde die kanzerogene Wirkung von Tetrachlormethan eindeutig nachgewiesen: sowohl bei Mäusen, Ratten und Hamstern konnten durch wiederholte Gaben von Tetrachlormethan Lebertumoren induziert werden (#69).

Eine chronische CCl_4-Exposition kann beim Menschen zur Lebervergrößerung, Verfettung und schließlich zur Zirrhose führen. Auch im Tierexperiment kann durch wiederholte Gabe von Tetrachlormethan eine Leberzirrhose leicht induziert werden. Die starke leberschädigende Wirkung von Tetrachlormethan wird beim Vergleich verschiedener chlorierter Kohlenwasserstoffe deutlich (siehe Tab. 1), dabei wird ein Zusammenhang zwischen

Tabelle 1

Relative Lebertoxizität verschiedener chlorierter, aliphatischer Kohlenwasserstoffe bezogen auf 1,1,1-Trichlorethan (nach #130)

Substanz	relative Hepatotoxizität
1,1,1-Trichlorethan, $H_3C\text{-}CCl_3$	1
Tetrachlorethen, $Cl_2C{=}CCl_2$	3
Trichlorethen, $Cl_2C{=}CHCl$	8
Tetrachlorethan, $Cl_2HC\text{-}CHCl_2$	12
1,1,2-Trichlorethan, $Cl_2HC\text{-}CH_2Cl$	40
Trichlorethan, $CHCl_3$	60
Tetrachlormethan, CCl_4	190

hepatotoxischer Wirkung und radikalischem Metabolismus der verschiedenen Substanzen für möglich gehalten (#130).

Auf zellulärer Ebene sind die ersten Veränderungen nach Tetrachlormethan-Intoxikation im endoplasmatischen Retikulum der zentrilobulären Hepatozyten feststellbar. Innerhalb von 30 bis 60 Minuten nach Tetrachlormethan-Gabe kommt es dort zu bläschenförmigen Auftreibungen und schließlich zur Fragmentierung des Membransystems, was mit dem Verlust von Ribosomen und dem Zerfall von Polysomen verbunden ist. Diese frühen Veränderungen gehen mit einem Abfall der hepatischen Proteinsynthese und einer Hemmung der Phosphatidylcholin-Biosynthese einher, gleichzeitig sinkt die Aktivität der membrangebundenen Enzyme Glucose-6-Phosphatase und Cytochrom P-450, dem zentralen Enzym des mikrosomalen Monooxygenasesystems. Innerhalb der nächsten zwei Stunden steigt der Triglyceridgehalt in der Leber stark an, was mit der Zerstörung des Synthese- und Sekretionsmechanismus von Lipoproteinen erklärt wird. Auch die Fähigkeit des endoplasmatischen Retikulums, Ca^{2+}-Ionen zu speichern, nimmt innerhalb der ersten 60 Minuten stark ab (#101;#117).

Veränderungen in den Mitochondrien treten dagegen mit einer deutlichen zeitlichen Verzögerung auf. Nach zwei bis vier Stunden verdoppelt sich deren Ca^{2+}-Gehalt und erreicht nach ca. vierzig Stunden einen zwanzigfach höheren Wert. Strukturelle Veränderungen wie Schwellung der Mitochondrien sind nach zehn bis sechzehn Stunden sichtbar, verbunden mit einem Verlust mitochondrialer Funktionen wie der Atmung und der Phosphorylierung.

Nach fünf bis zehn Stunden steigt die Aktivität hydrolysierender Enzyme an, was auf eine Schädigung der Lysosomen nach diesem Zeitraum hinweist. Lokale, zentrilobuläre Nekrosen und eine massive Fettinfiltration, sichtbar an tröpfchenartigen Fettansammlungen im Cytosol, sind nach sechs Stunden manifest; "balloon cells", d.h. Zellen mit Ausstülpungen an der Plasmamembran, sind nach zwölf Stunden sichtbar, nach ein bis zwei Tagen ist das Maximum der zentrilobulären Nekrosen und der Fettinfiltration erreicht.

1.3. Metabolismus von Tetrachlormethan

Seit 1951 ist bekannt, daß Tetrachlormethan im Organismus metabolisiert werden kann (#97). Aus den seither unternommenen Untersuchungen zur Aufklärung der Stoffwechselwege von Tetrachlormethan ergibt sich heute folgendes Bild (siehe Abb. 1):

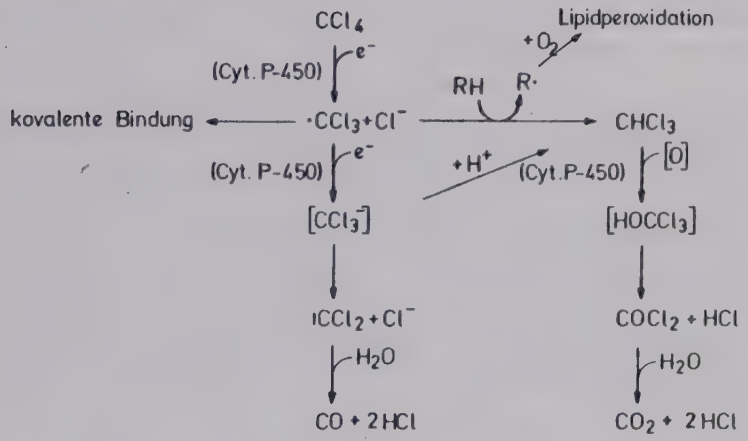


Abb. 1: Stoffwechselwege von Tetrachlormethan

Im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen wird Tetrachlormethan am Cytochrom P-450 gebunden und durch Übertragung eines Elektrons zu Chlorid-Ionen und Trichlormethylradikalen reduziert. Das intermediär auftretende Radikal kann einerseits unter Abstraktion von Wasserstoff aus endogenen Verbindungen zu Trichlormethan reagieren, andererseits kann das Trichlormethylradikal teilweise auch anaerob weiter reduziert werden, wobei ein Carben-Komplex entsteht, der nichtenzymatisch in Gegenwart von Wasser zu Kohlenmonoxid und Chlorwasserstoff zerfällt. Trichlormethan wird durch das Monooxygenasesystem oxidativ zu Phosgen metabolisiert, das in Gegenwart von Wasser unter Bildung von Kohlendioxid und Chlorwasserstoff hydrolysiert wird. Eine weitere Möglichkeit der Reaktion des Trichlormethylradikals ist seine kovalente Bindung an biologisches Material.

Die Bildung von Trichlormethan wurde 1961 von Butler nachgewiesen, der dabei eine homolytische Spaltung der C-Cl-Bindung postulierte (#21). 1964 zeigten Rubinstein und Kanics, daß das endoplasmatische Retikulum

der Leberzellen der Ort der Tetrachlormethan-Metabolisierung ist und unter aeroben Bedingungen als Hauptmetabolit Kohlendioxid entsteht (#146). Die intermediäre Bildung von Trichlormethylradikalen ist inzwischen durch Spin-Trapping-Experimente belegt (#126); als indirekter Beweis wird die Bildung von Hexachlorethan, $Cl_3C\text{-}CCl_3$, angesehen (#49;#175); allerdings konnte die Entstehung dieses Dimerisierungsprodukts von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden. Für die Beteiligung von Cytochrom P-450 an der reduktiven Bildung des Radikals sprechen Bindungsspektren (#137), die Hemmung der Metabolisierung durch Kohlenmonoxid und Sauerstoff (#175) und die NADPH-Abhängigkeit der Reaktion. Phosgen als Metabolit des oxidativen Abbaus von Tetrachlormethan wurde von Pohl et al. (#123) und Kubic & Anders (#82) nachgewiesen. Der anaerobe Metabolismus von Tetrachlormethan zu Kohlenmonoxid wurde von Ahr et al. untersucht (#1), für die intermediäre Bildung der Carbenstruktur sprechen spektroskopische Untersuchungen (#1;#197). Quantitativ spielt dieser Weg, vor allem unter aeroben Bedingungen, für die Metabolisierung von Tetrachlormethan kaum eine Rolle (#1). Auch die Möglichkeit der Bildung von Trichlormethan über das Trichlormethylcarbanion scheint Untersuchungen mit Deuteriumoxid zufolge keine große Bedeutung zu haben (#1;#83).

1.4. Mechanismus der Tetrachlormethan-abhängigen Schädigungsprozesse

Die These von Butler (#21), daß die durch homolytische Spaltung von Tetrachlormethan entstehenden Radikale für die Auslösung der hepatischen Schädigungsprozesse verantwortlich seien, ist inzwischen allgemein akzeptiert. So sprechen etwa die Schutzwirkung von Radikalfängern wie Vitamin E für das Trichlormethyl-Radikal als reaktives, toxisches Zwischenprodukt. Auch die geringere Toxizität von Trichlormethan ist ein Hinweis darauf, daß der erste Schritt der Tetrachlormethan-Metabolisierung hauptsächlich für die Toxizität dieser Substanz verantwortlich ist. Unklarheiten bestehen jedoch über die Art des Schädigungsmechanismus, der durch die Bildung der Radikale ausgelöst wird. Prinzipiell werden dabei zwei Möglichkeiten diskutiert:

- die Lipidperoxidations-These :

Sie geht davon aus, daß bei der Trichlormethan-Bildung durch Abstraktion von Wasserstoff aus polyungesättigten Fettsäuren der Membranlipide zunächst Fettsäure-Radikale entstehen, die dann in Sauerstoff-abhängigen Reaktionen zerfallen. Die Zellschädigung beruht nach dieser These auf

der toxischen Wirkung der Fettsäure-Zerfallsprodukte und/oder auf einer oxidativen Zerstörung der Membranstruktur.

- die These der kovalenten Bindung :

Als wesentlicher Schritt wird hier die Bindung der Trichlormethylradikale an biologisches Material der Zelle angesehen, wobei die gebildeten Additionsprodukte selbst, also ohne Beteiligung Sauerstoff-abhängiger Reaktionen, für die Zellschädigung verantwortlich wären.

1.4.1. Lipidperoxidations-These

Ursprünglich wurde der Begriff der Lipidperoxidation für Sauerstoff-abhängige Reaktionen eingeführt, die beim Ranzigwerden von Fetten bzw. bei der Lufttrocknung von Ölen beteiligt sind. Im allgemeineren Sinn wird hier unter Lipidperoxidation ein radikalisch initiierter, autokatalytisch verlaufender Zerfall von Lipiden unter der Beteiligung von Sauerstoff verstanden. Außer im Zusammenhang mit der Tetrachlormethan-Toxizität wird eine Beteiligung der Lipidperoxidation u.a. auch beim Alterungsprozeß, bei der Arthereosklerose, bei der Toxizität von reinem Sauerstoff, Ozon und Stickoxiden in Erwägung gezogen (#32;#122).

1.4.1.1. Modell der durch Eisenionen und NADPH induzierten Lipidperoxidation in Lebermikrosomen

Im biologischen System wurde die Lipidperoxidation vor allem in Lebermikrosomen untersucht, denen Eisenionen, meist in Form eines Komplexes mit ADP, und NADPH bzw. ein NADPH-regenerierendes System zugesetzt worden waren. Dieser enzymatische Prozeß wurde erstmals 1963 von Hochstein und Ernster beschrieben (#63), die in Rattenlebermikrosomen bei Anwesenheit von Sauerstoff, NADPH und ADP einen starken Sauerstoff-Verbrauch, eine Oxidation von NADPH und die Bildung von Malonaldehyd fanden. Später wurde nachgewiesen, daß Eisenionen, die als Verunreinigung im ADP enthalten waren, für diesen Prozeß notwendig sind (#64;#195). Als Folge der Lipidperoxidation nimmt der Gehalt an polyungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, in den Phospholipiden der Mikrosomen stark ab (#73;#80;#94;#95). Dadurch kommt es zu einer Desintegration des mikrosomalen Membransystems, einem Abfall der Enzymaktivität der Glucose-6-Phosphatase (#196) und der Inaktivierung von Cytochrom P-450 (#87).

Cytochrom P-450 ist an der Auslösung der Lipidperoxidation in diesem Modellsystem wohl nicht direkt beteiligt; jedenfalls kann die Lipidper-

oxidation im rekonstituierten System allein mit der NADPH-abbhängigen Cytochrom P-450-Reduktase in Gegenwart von NADPH, Eisenionen und Phospholipiden ablaufen (#115). Möglicherweise besteht die Funktion der NADPH-abhängigen Cytochrom P-450-Reduktase nur darin, Fe^{3+}-Ionen zu Fe^{2+}-Ionen zu reduzieren; auch Fe^{2+}-Ionen allein, ohne Zusatz von NADPH, können die Lipidperoxidation vorantreiben (#80). Über die genaue Rolle des Eisens bzw. über die Art der Sauerstoffaktivierung bei der Peroxidation der polyungesättigten Fettsäuren in diesem Prozeß besteht jedoch keine endgültige Klarheit; diskutiert werden dabei die Bildung von Superoxidanionen bzw. Perferrylionen (#116;#170), Hydroxylradikalen (#47;#84;#85) und Singulett-Sauerstoff (#103) als eigentlichen Agenzien bei der Initiation der Lipidperoxidation.

Im einzelnen stellt man sich den Mechanismus der Lipidperoxidation folgendermaßen vor:

Durch den radikalischen Initiationsprozeß entstehen durch Abstraktion von Wasserstoff aus den polyungesättigten Fettsäuren, die in den mikrosomalen Phospholipiden in hoher Konzentration vorliegen, zunächst Fettsäure-Radikale, deren Bildung durch Delokalisation des ungepaarten Elektrons über die Pentadienylstruktur begünstigt ist. Nach Reaktion mit Sauerstoff entstehen daraus Fettsäureperoxy-Radikale, die unter erneuter Abstraktion von Wasserstoff aus anderen polyungesättigten Fettsäuren zu Hydroperoxiden abreagieren (Abb. 2).

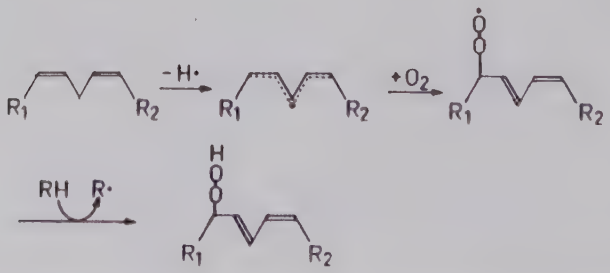


Abb. 2: radikalisch initiierte Bildung von Fettsäurehydroperoxiden
$R_1 = CH_3-(CH_2)_m-$; $R_2 = -(CH_2)_n-COOH$

Die Anlagerung des Sauerstoffs kann dabei in Position 1 oder 5 der Pentadienylstruktur unter Ausbildung eines konjugierten Diens erfolgen. Quantitativ lassen sich diese Diene durch Messung ihrer Absorption bei 236 nm bestimmen. Eine Dimerisierung der entstandenen Radikale führt schließlich zum Abbruch der Kettenreaktion.

Die entstandenen Fettsäurehydroperoxide sind nicht sehr stabil und können in Gegenwart von Eisen- oder anderen Übergangsmetallionen leicht zerfallen:

$$ROOH + Fe^{2+} \text{ --- } RO^{\cdot} + HO^{-} + Fe^{3+}$$
$$ROOH + Fe^{3+} \text{ --- } ROO^{\cdot} + H^{+} + Fe^{2+}$$

In diesem Prozeß können eisenhaltige Proteine eine Rolle spielen; speziell Cytochrom P-450 dürfte beim Zerfall der Fettsäurehydroperoxide und damit an der Propagation der Lipidperoxidation beteiligt sein (#110; #111;#166). Da hierbei neue Radikalkettenreaktionen initiiert werden können, kann der autokatalytische Prozeß der Fettsäurezerstörung theoretisch so lange weiterlaufen, bis keine geeigneten Substrate mehr zur Verfügung stehen.

Als stabile Zerfallsprodukte der Fettsäurehydroperoxide sind verschiedene Verbindungen nachgewiesen worden, die Hydroxyl-, Keto-, Aldehyd- oder Epoxygruppen enthalten (#20;#42). Analytische Bedeutung haben die Zerfallsprodukte Malonaldehyd, Ethan und Pentan erlangt.

Die Bildung von Malonaldehyd verläuft wahrscheinlich über zyklische Peroxide:

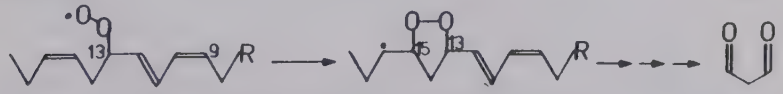
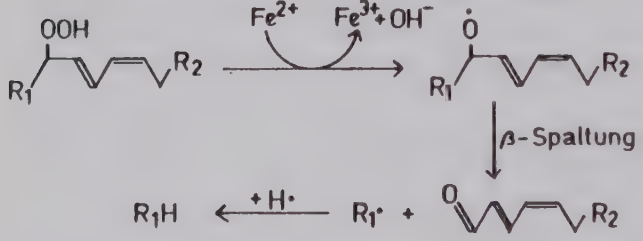


Abb. 3: Bildung von Malonaldehyd aus Linolensäure (R = $(CH_2)_6$-COOH)

Vorwiegend entsteht Malonaldehyd aus peroxidierten Fettsäuren mit drei oder mehr Doppelbindungen (#29), unter bestimmten Bedingungen wird Malonaldehyd aber auch aus dem Hydroperoxid der Linolsäure gebildet (#5). Zum Nachweis von Malonaldehyd wird seine Farbreaktion mit Thiobarbitursäure verwendet (#20), das Ausmaß der Reaktion ist stark von den Reaktionsbedingungen wie pH, Konzentration an Eisensalzen und Anwesenheit von Antioxidantien abhängig (#5;#6;#29;#168). Außerdem kann Thiobarbitursäure auch mit anderen Aldehyden, z.B. auch Zuckern wie Arabinose, farbige Verbindungen bilden, die die Malonaldehyd-Bestimmung verfälschen können

(#74;#190). Normalerweise werden nur etwa zehn bis zwanzig Prozent der peroxidierten Fettsäuren durch die Malonaldehydbildung erfaßt (#95;#168), dabei besteht eine gute Korrelation zwischen der Malonaldehydbildung und der Abnahme an Arachidonsäure (#73). In Mitochondrien wird Malonaldehyd rasch metabolisiert (#132), weshalb die Aussagekraft des Thiobarbitursäure-Tests bei Versuchen in vivo gering ist.

Die Bildung von Ethan und Pentan wird auf den peroxidativen Zerfall von (ω-3)- bzw. (ω-6)-ungesättigten Fettsäuren zurückgeführt (#39;#79). Nach Dumelin & Tappel (#39) bzw. Lieberman & Mapson (#88) könnte die Kohlenwasserstoff-Bildung folgendermaßen ablaufen:



(ω-6)-ungesättigte Fettsäuren: $R_1 = C_5H_{11}$, RH = Pentan
(ω-3)-ungesättigte Fettsäuren: $R_1 = C_2H_5$, RH = Ethan

Abb. 4: Bildung von Ethan und Pentan bei der Peroxidation polyungesättigter Fettsäuren

Allerdings sind die Mengen der gebildeten Kohlenwasserstoffe im Vergleich zur Abnahme an polyungesättigten Fettsäuren sehr gering; Dumelin und Tappel fanden im chemischen System mit Eisenionen eine Ausbeute von etwa 1 Mol-Prozent Ethan bei der Peroxidation von Linolensäure und 0,4 Mol-Prozent Pentan bei der Peroxidation von Arachidonsäure (#39). Die gaschromatographische Betimmung der Kohlenwasserstoffe als Maß für die Lipidperoxidation hat sich insbesondere bei Experimenten in vivo durchgesetzt, bei denen diese Kohlenwasserstoffe in der Atemluft der Versuchstiere, also nicht invasiv, gemessen werden können (#36;#50;#142). Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß Ethan und besonders Pentan vom Organismus oxidativ abgebaut werden können; eine erhöhte Ethan- und Pentanabatmung kann daher auch aus einer Hemmung der Metabolisierung

dieser Substanzen herrühren und darf deshalb nicht unbedingt als Zeichen einer verstärkten Lipidperoxidation gedeutet werden (#45;#51).

1.4.1.2. Hämolysemodell der Lipidperoxidation

1966 wurde von Hochstein die Beobachtung veröffentlicht, daß Erythrozyten bei der Inkubation mit peroxidierenden Mikrosomen hämolysieren (#65). Dieses Modell wurde in der Folgezeit von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der Schädigungsmechanismen im Zusammenhang mit der Lipidperoxidation herangezogen (#11;#121;#143;#144;#151;#152;#177; #191). Pfeifer und McCay (#121) interpretierten ihre Ergebnisse mit diesem Modell dahingehend, daß bei der Inkubation von Mikrosomen mit NADPH freie Radikale entstehen, möglicherweise Hydroxylradikale, die sowohl die Peroxidation mikrosomaler Lipide initiieren als auch in einem davon unabhängigen Prozeß direkt die Erythrozytenhämolyse bewirken. Dieser Auffassung widersprachen spätere Ergebnisse verschiedener anderer Arbeitsgruppen; deren Ergebnisse legten nahe, daß die Erythrozytenschädigung durch Produkte verursacht werden, die erst als Folge der Lipidperoxidation entstanden sind. Daß es sich bei diesen Produkten nicht um kurzlebige Radikale handeln konnte, ging daraus hervor, daß sie dialysiert (#11), filtriert (#143) bzw. extrahiert (#191) werden konnten, ohne ihre hämolytische Eigenschaft zu verlieren. Der Grund für die Diskrepanz zwischen diesen Versuchen und den Experimenten von Pfeifer & McCay ist nicht klar, möglicherweise könnten dafür Unterschiede im Vitamin-E-Status der verwendeten Erythrozyten eine Rolle gespielt haben (#192).

Als Substanzen, die für die hämolytische Wirkung verantwortlich sein könnten, wurden die bei der Lipidperoxidation gebildeten Fettsäurehydroperoxide (#55;#157;#177;#191) oder ihre Zerfallsprodukte, speziell 4-Hydroxynonenal (#14;#67), postuliert.

1.4.1.3. Lipidperoxidation als Ursache der Tetrachlormethan-Toxizität

Nach der Theorie von Recknagel et al. (#134) sollen bei der CCl_4-Vergiftung die metabolisch gebildeten Trichlormethyl-Radikale oder Trichlormethylperoxy-Radikale (#159;#198) durch Abstraktion von Wasserstoff aus den polyungesättigten Fettsäuren der mikrosomalen Phospholipide die Lipidperoxidation und damit den Mechanismus der Toxizität auslösen. Als Beweis für die Beteiligung der Lipidperoxidation bei der CCl_4-Toxizität führten Recknagel und Ghoshal die Erhöhung der Dienkonjugation und die

Abnahme von Arachidonsäure in den mikrosomalen Lipiden von Ratten an, die mit Tetrachlormethan behandelt wurden, ferner die Stimulation der Malonaldehyd-Bildung durch Tetrachlormethan bei der aeroben Inkubation von Mikrosomen mit NADPH (#132); im Hämolysemodell korreliert die Erythrozytenschädigung bei der aeroben Inkubation von Mikrosomen mit NADPH und Tetrachlormethan ebenfalls mit der Malonaldehyd-Bildung (#151;#152). Von der Arbeitsgruppe um Recknagel gab es zunächst auch Hinweise dafür, daß die Zerstörung der Glucose-6-Phosphatase und des Cytochroms P-450, die nach CCl_4-Vergiftung in vivo beobachtet wurde, auf die Lipidperoxidation und nicht auf eine kovalente Bindung von CCl_3-Radikalen zurückzuführen seien (#55;#134). Ein direkter chemischer Nachweis für die Entstehung peroxidierter Lipide nach Tetrachlormethanverabreichung in vivo wurde von Mitchell et al. geliefert: Aus dem Leberhomogenat von Mäusen, die mit Tetrachlormethan behandelt worden waren, konnten Fettsäurehydroxide und -hydroperoxide isoliert und durch GC-MS identifiziert werden (#99); ob in vivo relevante Mengen an Fettsäurehydroperoxiden gebildet werden, ist aber fraglich. Die verstärkte Abatmung von Ethan und Pentan, die nach CCl_4-Exposition von Ratten in vivo festzustellen ist, wird ebenfalls als Indiz für eine Beteiligung der Lipidperoxidation bei der CCl_4-Intoxikation angesehen (#45;#142;#147).

Dennoch ist die These, daß die Toxizität von Tetrachlormethan eine Folge der durch Trichlormethylradikale ausgelösten Lipidperoxidation sei, nicht unwidersprochen geblieben; in den letzten Jahren haben sich die Zweifel an diesem Konzept eher verstärkt. Für die Kritik werden folgende Gesichtspunkte angeführt:

- Im Gegensatz zur Fe^{2+}/NADPH-induzierten Lipidperoxidation läuft die CCl_4-abhängige Lipidperoxidation in vitro, also im mikrosomalen System, bei Abwesenheit von Eisenionen nur in beschränktem Maße ab und kommt schon nach 30 Minuten zum Stillstand, wenn erst 10 Prozent der polyungesättigten Fettsäuren zerstört sind (#81); dabei wird die Cytochrom P-450-Aktivität jedoch fast vollständig gehemmt. Eine CCl_4-abhängige Schädigung ohne nennenswerte Beteiligung der Lipidperoxidation konnte auch bei Experimenten mit Hepatozyten nachgewiesen werden (#162).
- De Groot & Haas und Masuda bewiesen, daß eine Cytochrom P-450-Schädigung auch beim anaeroben Metabolismus von Tetrachlormethan stattfindet, also nicht mit der Lipidperoxidation gekoppelt sein muß (#31;#93).

- Verschiedene Stoffe, die eine Schutzwirkung gegen die CCl_4-induzierte Lebernekrose zeigen, haben keinen Einfluß auf die Lipidperoxidation (#122).
- Fraglich ist außerdem, ob in vivo die Sauerstoffkonzentration in den Hepatozyten für eine massive Lipidperoxidation ausreicht. Da Tetrachlormethan bei der Bindung an Cytochrom P-450 mit Sauerstoff konkurriert (#137), wird mit sinkendem Sauerstoffdruck einerseits die CCl_4-Metabolisierung beschleunigt, andererseits werden peroxidative Prozesse gleichzeitig zurückgedrängt. Kieczka (#78) fand bei der CCl_4-Metabolisierung im mikrosomalen System in vitro eine maximale Lipidperoxidation (gemessen als Malonaldehyd) bei einer Sauerstoffkonzentration von 7 Prozent, was einem Sauerstoffpartialdruck von etwa 50 Torr entspricht. In der Leber herrscht ein steiler Sauerstoffgradient von der periportalen zur zentrilobulären Seite der Leberläppchen; die durch Tetrachlormethan hervorgerufenen Nekrosen treten aber zuerst im zentrilobulären Bereich auf, in dem der Sauerstoffpartialdruck nur noch wenige Torr beträgt. Insbesondere dürfte unter hypoxischen Bedingungen, bei denen die Toxizität von Tetrachlormethan stark erhöht ist, das Lipidperoxidations-Optimum von 50 Torr für den Sauerstoffpartialdruck weit unterschritten sein (#38).
- Auch muß die Rolle von toxischen Produkten der Lipidperoxidation wie das oben erwähnte 4-Hydroxynonenal als Vermittler des Schädigungsprozesses in Frage gestellt werden: 4-Hydroxynonenal wirkt erst bei relativ hohen Konzentrationen, wird aber durch SH-Verbindungen schnell inaktiviert (#135;#136).

Aus diesen und anderen Gründen kommt Recknagel, der die These der Lipidperoxidation als kausale Ursache für die CCl_4-Toxizität begründete, nun zu einer kritischeren Einschätzung (#135;#136). Vor allem ist nach wie vor ungeklärt, über welche Mechanismen die initiale Schädigung, in diesem Fall also die Lipidperoxidation, zu den pathologisch faßbaren Erscheinungen wie der Triglyceridakkumulation, der Degranulation des endoplasmatischen Retikulums und der Hemmung der Proteinbiosynthese und schließlich zur Nekrose der Leberzellen führt. Dies gilt allerdings bisher auch für die "Alternativthese" der kovalenten Bindung.

1.4.2. Kovalente Bindung von Trichlormethyl-Radikalen als Ursache der Tetrachlormethan-Toxizität

Die kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten an biologisches Material in der Leber wurde erstmals von Reynolds (#140) untersucht. Zwei Stunden nach Gabe von $[^{14}C]$-Tetrachlormethan in vivo fand er im Leberhomogenat von Ratten 40 Prozent der nichtflüchtigen Radioaktivität in den Lipiden, 15 Prozent in Proteinen und 10 Prozent als säurelösliches Material; die Lipidbindung betraf dabei in erster Linie die Mikrosomenfraktion. Bei Verwendung von $[^{36}Cl]$-Tetrachlormethan war in den Mikrosomen eine ähnlich hohe Lipidbindung zu finden, in diesem Fall stieg jedoch der Anteil der säurelöslichen Radioaktivität im Cytosol stark an, was Reynolds der Bildung von Chlorid-Ionen aus Tetrachlormethan zuschrieb. Spätere Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen bestätigten ebenfalls eine bevorzugte kovalente Bindung von $^{14}CCl_4$-Metaboliten in vivo an Lipide des endoplasmatischen Retikulums (#34;#131;#176).

Für die Hypothese, daß die leberschädigende Wirkung von Tetrachlormethan vor allem auf der kovalenten Bindung seiner Metaboliten an wichtige Zellstrukturen beruht, sprechen insbesondere Untersuchungen von Diaz Gomez et al. (#35) bei verschiedenen Tierarten: die durch Tetrachlormethan ausgelösten Leberschäden korrelierten bei den verschiedenen Tierspezies weit besser mit der kovalenten Lipidbindung als mit der Lipidperoxidation (gemessen als Zunahme der Dienkonjugation im Lipidextrakt). Ähnlich verhält es sich bei einer Vorbehandlung von CCl_4-behandelten Ratten mit Cysteamin, was gleichermaßen die irreversible Lipidbindung wie die Bildung einer Lebernekrose bzw. die Fettinfiltration in die Leber hemmt, aber keinen Einfluß auf die Lipidperoxidation hat (#25). Mit Hepatozyten konnte unlängst gezeigt werden, daß auch die Hemmung der Sekretion von Lipoproteinen durch Tetrachlormethan eng mit der irreversiblen Bindung von CCl_4-Metaboliten korreliert, vom Ausmaß der Lipidperoxidation aber kaum berührt wird (#33). Aus ähnlichen Gründen neigen auch andere Autoren zu der Auffassung, daß die kovalente Bindung ein wesentlicher Faktor der CCl_4-abhängigen Leberschädigung ist (#54;#141).

Studien in vitro mit Rattenlebermikrosomen zeigten eine starke Abhängigkeit der kovalenten Lipidbindung vom Sauerstoffpartialdruck. Villarruel et al. (#182) fanden unter anaeroben Bedingungen eine siebenfach höhere Lipidbindung als unter normaler Luft; nach Untersuchungen von Kieczka (#78) fiel die kovalente Lipidbindung bei einer Sauerstoffkonzen-

tration von etwa vier Prozent auf die Hälfte des unter anaeroben Bedingungen gemessenen Wertes und war bei zwanzig Prozent Sauerstoff kaum mehr meßbar. Gegenüber der kovalenten Bindung an Proteine war die Lipidbindung unter anaeroben Bedingungen um das drei- bis vierfache stärker ausgeprägt (#78;#176). Die kovalente Bindung an Proteine betrifft in erster Linie die Phenobarbital-induzierbare Form des Cytochroms P-450 (#52;#61), was auf die Bildung der reaktiven Metaboliten an diesem Enzym hinweist.

Da die Phospholipide den größten Teil der mikrosomalen Lipide ausmachen, ist es nicht verwunderlich, daß die Hauptmenge an kovalent modifizierten Lipiden in dieser Fraktion gefunden wurde (#176;#182). Hauptbestandteil der mikrosomalen Phosholipide ist das Phosphatidylcholin, das dabei auch den quantitativ höchsten Anteil der kovalenten Bindung aufwies.

Über die molekularen Strukturen der Addukte reaktiver CCl_4-Metaboliten mit Lipiden ist bisher wenig bekannt. Gordis (#56) fand in vivo mit $^{14}C^{36}Cl_4$ eine Bindung von $^{14}C:^{36}Cl$ im Verhältnis 1:3 an die Fettsäurereste der mikrosomalen Phospholipide, was für eine Addition von Trichlormethyl-Radikalen an Fettsäure-Doppelbindungen spricht. In einem rekonstituierten System, das Cytochrom P-450, NADPH-abhängige Cytochrom-P-450-Reduktase und Cytochrom b_5 in Phospholipidvesikeln mit einem hohen Gehalt an Dioleyl-Phosphatidylcholin enthielt, wurde die Bildung von 9- und 10-Trichlormethylstearylestern nachgewiesen (#173). Weiterhin gibt es massenspektrometrische Hinweise für die Bildung von CCl_3-Addukten mit Cholesterin nach Intoxikation von Tetrachlormethan in vivo (#3).

1.5. Gegenstand der Arbeit

Die Frage, ob für die Toxizität von Tetrachlormethan primär die Lipidperoxidation oder die kovalente Bindung reaktiver Metaboliten ursächlich verantwortlich ist, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Im mikrosomalen System und auch in vivo können beide Prozesse als Folge der CCl_4-Metabolisierung ablaufen; über die Mechanismen, die schließlich zum Zelltod führen, gibt es jedoch nur wenige gesicherte Erkenntnisse.

Bei der Lipidperoxidation wird den Fettsäurehydroperoxiden und einigen ihrer Zerfallsprodukte eine Rolle als direkt wirkende Toxine zugeschrieben. Da Arachidonsäure den Hauptanteil der ungesättigten Fettsäuren in den Mikrosomen stellt, dürfte den Hydroperoxiden dieser Fettsäure die größte Bedeutung zukommen. Mit enzymatisch synthetisiertem Arachidonsäurehydroperoxid sollte am Erythrozyten-Modell untersucht werden, ob diese

Substanz als hämolytisches, also direkt membranschädigendes Agens in Frage kommt.

Weiter sollte der Einfluß dieses Hydroperoxids und seiner Zerfallsprodukte auf mikrosomale Cytochrome untersucht und mit den Verhältnissen der Cytochrom-P-450-Schädigung bei der durch Eisenionen und NADPH ausgelösten mikrosomalen Lipidperoxidation verglichen werden. Dabei sollten auch die quantitativen Verhältnisse zwischen der Abnahme der polyungesättigten Fettsäuren, der Malonaldehyd-Bildung und der Entstehung von Ethan und Pentan bei der mikrosomalen Lipidperoxidation ermittelt werden.

Die Effekte der kovalenten Bindung reaktiver CCl_4-Metaboliten können von peroxidativen Prozessen im mikrosomalen System experimentell durch anaerobe Versuchsdurchführung abgegrenzt werden. Gleichzeitig ist unter anaeroben Bedingungen die Metabolisierungsrate von Tetrachlormethan maximal.

Im anaeroben System sollte die Metabolisierung von Tetrachlormethan und die Bildung von Trichlormethan direkt gemessen werden. Dabei sollte untersucht werden, wie sich die Metabolisierung unter diesen Bedingungen auf die Zerstörung von Cytochrom P-450, die Abnahme der ungesättigten Fettsäuren und die Bildung von Malonaldehyd, Ethan und Pentan auswirkt im Vergleich zu den Verhältnissen bei rein peroxidativen Prozessen.

Die Produkte der kovalenten Bindung von reaktiven CCl_4-Metaboliten an mikrosomale Lipide sind bisher kaum untersucht. Durch Verwendung von $[^{14}C]$-Tetrachlormethan bei der Inkubation mit Mikrosomen können diese Produkte radioaktiv markiert werden; unter anaeroben Bedingungen sollte die zur Strukturaufklärung nötige Menge dieser Produkte gebildet werden können. Wegen der Heterogenität der zu erwartenden Produkte wurden zur Trennung chromatographische Verfahren wie DC, HPLC und GC eingesetzt; für die Strukturaufklärung stand ein Massenspektrometer zur Verfügung. Bei Kenntnis der Struktur der kovalent modifizierten Lipide ist es möglich, eindeutige Aussagen über die Struktur des reaktiven Metaboliten und den Mechanismus der kovalenten Bindung zu machen.

Über die biochemischen Eigenschaften kovalent modifizierter Lipide gibt es bisher keine Untersuchungen. Aufgrund der zentralen Rolle des endoplasmatischen Retikulums für die Lipidbiosynthese der Zelle können Veränderungen im physiologischen Verhalten solcher modifizierten Lipide aber zu weitreichenden Konsequenzen für die Funktionsfähigkeit der Zelle führen. Ein wichtiger Mechanismus für die Regulation des Lipidstoff-

wechsels sind De- und Reacylierungsreaktionen an den membrangebundenen Phospholipiden; die Spaltbarkeit modifizierter Phospholipide durch Phospholipasen zur Entfernung der durch die kovalente Bindung pathologisch veränderten Fettsäuren stellt ein erstes Kriterium zur Beurteilung der Frage dar, über welche Mechanismen die Produkte der kovalenten Bindung in den Zellstoffwechsel eingreifen können. Daher sollten Untersuchungen zur Kinetik der enzymatischen Hydrolyse von Phosphatidylcholin, das aus Mikrosomen nach der Metabolisierung von Tetrachlormethan isoliert wurde, mit Phospholipase A_2 durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Biochemikalien

2.1.1. Chemikalien

Arachidonsäure 75% (Dichte ca. 0,9 g/ml)	Merck,Darmstadt
Arachidonsäure aus Schweineleber, 99% (0,92 g/ml)	Sigma Chemie, München
n-Heptadecansäure 99%	Sigma Chemie, München
Ölsäuremethylester ca. 99%	Sigma Chemie, München
Dibromstearinsäuremethylester 99%	Nu Chek Prep, Kopenhagen
Bortrifluorid 14% in Methanol p.A.	Serva, Heidelberg
Ethylmorphinhydrochlorid (MG 385,9)	Merck, Darmstadt
D,L-Isocitronensäure Na_3-salz·$2H_2O$ reinst, 98%, allofrei (MG 294,1)	Serva, Heidelberg
NADP (ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat) Dinatriumsalz, 98% (MG 787,4)	Boehringer, Mannheim
NADH (ß-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert) Dinatriumsalz, Grad II, 98% (MG 709,4)	Boehringer, Mannheim
ADP (Adenosin-5'-diphosphorsäure) kristallisierte freie Säure (MG 427,2)	Boehringer, Mannheim
Platin-IV-oxid	Ventron, Karlsruhe
Laborgase:	
Stickstoff 99,996%	
Synthetische Luft (Kohlenwasserstoff-frei)	
Wasserstoff 99,999%	
Argon-Methan (10 Vol% Methan in Argon)	
Helium 99,998%	
Isobutan 99,95%	
Ammoniak 99,8%	Messer Griesheim, Düsseldorf

Bei den übrigen Laborchemikalien handelte es sich um analysenreine Substanzen der Firmen Merck, Darmstadt und Riedel-de Haen, Seelze. Organische Lösungsmittel wurden vor der Verwendung in der Regel frisch destilliert.

2.1.2. Radioaktiv markiertes Tetrachlormethan

[^{14}C]-Tetrachlormethan wurde von Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen. Die Liefercharge enthielt nach Werksangabe 500 µCi radioaktives Material mit einer spezifischen Aktivität von 26,9 Ci/Mol und einer radiochemischen Reinheit von 99 Prozent. Das Material, das in einer Brechsiegelampulle eingeschmolzen war, wurde durch Anlegen eines Vakuums (0,3 Torr) in ein spitz zulaufendes Reagenzglas überdestilliert, das 200 µl Ethanol enthielt und mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Auf diese Weise konnten ca. 80 Prozent der Gesamtaktivität in die Ethanol-Vorlage überführt werden; 1 µl der ethanolischen Lösung enthielt 2,0 µCi radioaktives Material entsprechend 74,3 nMol Tetrachlormethan.

Das sehr hoch markierte Tetrachlormethan wurde aus finanziellen Gründen und zur Verminderung unnötiger Strahlenbelastung für die Mikrosomeninkubation mit unmarkiertem Tetrachlormethan verdünnt. Dazu wurde zunächst eine Lösung von einem Volumenteil unmarkiertem Tetrachlormethan in neun Volumenteilen Ethanol hergestellt; 1 µl dieser Lösung enthielt somit 1,03 µMol Tetrachlormethan. Von dieser Lösung und von der Lösung, die das markierte Tetrachlormethan enthielt, wurden gleiche Volumina gemischt, so daß 1 µl der Mischung 552 nMol Tetrachlormethan mit einer spezifischen Aktivität von 1,82 Ci/Mol enthielt (1,0 µCi/µl Mischung).

2.1.3. Enzyme und Proteine

Lipoxidase (Linoleate:oxygen oxidoreductase; E.C. 1.13.1.13)
Typ 1 aus Sojabohnen; 153 200 Units/mg Protein in kristalliner Form.
Ein Unit entspricht 0,001 OD bei 234 nm pro Minute bei pH 9 und 25°C mit Linolsäure als Substrat bei einem Volumen von 3 ml und einem Lichtweg von 1 cm; damit entspricht ein Unit einem Umsatz von 0,12 µMol Substrat/min.

Sigma Chemie, München

Isocitrat-Dehydrogenase
(D-Isocitrat:NADP oxidoreductase, decarboxylating; E.C. 1.1.1.42)
aus Schweineherz, Reinheitsgrad II, Lösung in Glycerin (10 mg/ml), spezifische Aktivität ca. 2 Units/mg; ein Unit entspricht dem Umsatz von einem µMol Isocitrat pro Minute bei 25°C.

Boehringer, Mannheim

Phospholipase A_2
(Phosphatide 2-acyl-hydrolase; E.C. 3.1.1.4)

a) aus Schlangengift (Naja naja); lyophilisiertes Pulver,
nominale Aktivität 425 Units/mg Protein.
Ein Unit entspricht der Hydrolyse von einem µMol Lecithin aus Eigelb
pro Minute bei pH 8,9 und 25°C — Sigma Chemie, München

b) aus Schweine-Pankreas; Suspension in 3,2 M Ammoniumsulfatlösung
(9 mg Protein/ml); nominale Aktivität 900 Units/mg Protein.
Ein Unit entspricht der Hydrolyse von einem µMol Lecithin aus Eigelb
pro Minute bei pH 8,0 und 37°C. — Sigma Chemie, München

Rinderserumalbumin (BSA) — Schering, Berlin

2.1.4. Materialien für die Chromatographie

Sephadex G-25 coarse	Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Schweden
Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie Korngröße 0,063 - 0,200 mm	Merck, Darmstadt
DC-Fertigplatten Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm 5x20 cm bzw. 20x20 cm	Merck, Darmstadt
HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 (Nano-Platten Sil 20), Schichtdicke 0,20 mm; 10x20 cm	Macharey-Nagel, Düren
Hibar-Fertigsäule 250x4 mm, Säulenfüllung LiChrosorb RP-18, mittlere Korngröße 10 µm	Merck, Darmstadt
Perisorb RP-18, Korngröße 30-40 µm	Merck, Darmstadt
Chromosorb W 80-100 mesh	Hewlett-Packard, Böblingen
Porasil C 80-100 mesh	Waters, Milford (USA)
FFAP (free fatty acid phase)	Chrompack, Berlin
SP 2100	Supelco, Houston (USA)
OV 101	Supelco, Houston (USA)

Referenzsubstanzen für die Gas- und Dünnschichtchromatographie:

Fettsäuremethylester der Palmitinsäure, n-Heptadecansäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Arachidonsäure und Docosahexaensäure
Sigma Chemie, München

1-Palmitoyl-2-oleyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholin
Sigma Chemie, München

1-Palmitoyl-2-oleyl-sn-glyceryl-3-phosphorylethanolamin
Serva, Heidelberg

1,2-Dipalmitoyl-sn-glyceryl-3-phosphorylserin
Serva, Heidelberg

1-Heptadecanoyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholin
(Lysophosphatidylcholin) Sigma Chemie, München

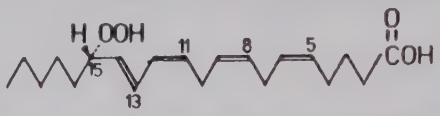
1-Palmitoyl-glyceryl-3-phosphorylethanolamin
(D,L-Lysophosphatidylethanolamin) Serva, Heidelberg

2.2. Synthese und Isolierung von 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

Fettsäurehydroperoxide können aus polyungesättigten Fettsäuren enzymatisch mit Hilfe von Lipoxidasen synthetisiert werden. Lipoxidasen sind im Pflanzenreich weit verbreitet; die wohl am besten untersuchte pflanzliche Lipoxidase ist diejenige aus Sojabohnen vom Typ 1, die auch kommerziell erhältlich ist. Dieses Enzym katalysiert die Peroxidation von Fettsäuren, die eine cis,cis-1,4-Pentadienylstruktur mit der Methylengruppe an Position ω-8 (8. C-Atom vom Methylende der Fettsäure her gerechnet) enthalten (#60;#129). Als Produkte der stereospezifischen Peroxidation entstehen dabei in erster Linie (ω-6)-L-Hydroperoxide unter Ausbildung eines konjugierten Diens mit Doppelbindungen in Position ω-7 (trans) und ω-9 (cis):

Daneben können auch (ω-10)-Hydroperoxide und dioxygenierte Produkte entstehen (#17;#27;#60); diese Produkte treten hauptsächlich bei niederen pH-Werten (pH 6,8) auf und können durch die Wahl eines stärker alkalischen Puffers (pH 9) und durch Senkung der Reaktionstemperatur auf 0°C

weitgehend zurückgedrängt werden (#27). Mit Arachidonsäure als Substrat entsteht bei pH 9 demnach als Hauptprodukt der Reaktion die 15-L-Hydroperoxy-5(cis),8(cis),11(cis),13(trans)-eicosatetraensäure, 15-HPETE (#53):



Die Lipoxidase wird bei dieser Reaktion im Verhältnis zur umgesetzten Menge des Substrats irreversibel zerstört (#160;#161). Das Enzym muß deshalb bei einer Synthese der Fettsäurehydroperoxide im präparativen Maßstab in verhältnismäßig hohen Mengen eingesetzt werden.

In einem Erlenmeyerkolben wurden 200 µl einer 75-prozentigen Arachidonsäure (ca. 400 µMol) in 250 ml Natriumboratpuffer (0,1 M; pH 9) durch starkes Rühren suspendiert. Durch Zugabe von 2,5 mg Lipoxidase (entspricht 380 000 Units) wurde die Reaktion gestartet; während der Reaktion wurde in die auf 0°C gekühlte Inkubationslösung mit einer Pasteurpipette ein feiner Sauerstoffstrom eingeleitet.

Nach 60 Minuten wurde die inzwischen klare Lösung mit 25 ml einer 1 N Zitronensäurelösung angesäuert und zur Extraktion der Produkte dreimal mit 150 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, anschließend wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur entfernt, der Rückstand in einigen Millilitern einer Lösung von einem Prozent Methanol in Toluol (v/v) aufgenommen, filtriert, im Rotationsverdampfer wieder eingeengt und schließlich in einem Milliliter des gleichen Lösungsmittels gelöst.

Eine dünnschichtchromatographische Analyse der Produkte (siehe unten) zeigte außer dem entstandenen Hydroperoxid nicht umgesetzte Arachidonsäure und in geringen Mengen stärker polare Produkte.

Die weitere Reinigung erfolgte auf einer Kieselgelsäule (0,8 x 20 cm), die mit 100 ml einer Lösung von einem Prozent Methanol in Toluol (v/v) äquilibriert worden war. Nach dem Substanzauftrag wurde zuerst mit 45 ml einer Lösung von zwei Prozent Methanol in Toluol (v/v) eluiert, dann wurde der Methanolgehalt auf acht Prozent erhöht; das Eluat wurde in Fraktionen von ca. 4 ml gesammelt. Zur Verfolgung der Trennung wurden von jeder Fraktion 15 µl dünnschichtchromatographisch untersucht. Aufgrund dieser Analyse wurden die Hydroperoxid-haltigen Fraktionen vereinigt, nach Einengen am Rotationsverdampfer mit Ether in eine Bördelkappen-Ampulle über-

führt und nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels unter Stickstoff das Gewicht bestimmt. Das gewogene Produkt wurde in einer definierten Menge Ethanol gelöst und bei -25°C gelagert.

Bei einer zweiten Präparation wurden 100 µl der 75-prozentigen Arachidonsäure in 170 ml Natriumboratpuffer mit 2 mg Lipoxidase unter sonst gleichen Bedingungen umgesetzt und die entstandene Hydroperoxy-eicosatetraensäure wie oben beschrieben gereinigt.

Dünnschichtchromatographie der Produkte:

DC-Fertigplatten Kieselgel 60, aktiviert bei 120°C
Laufmittel: n-Hexan - Diethylether - Essigsäure (50:50:1; v/v)
mit 5 mg 2,6-Di-t-butyl-p-cresol (BHT) pro 100 ml Lösung
Laufzeit ca. 40 Minuten; Laufstrecke ca. 16 cm
Detektion der Produkte durch Joddampf (Gelbfärbung)

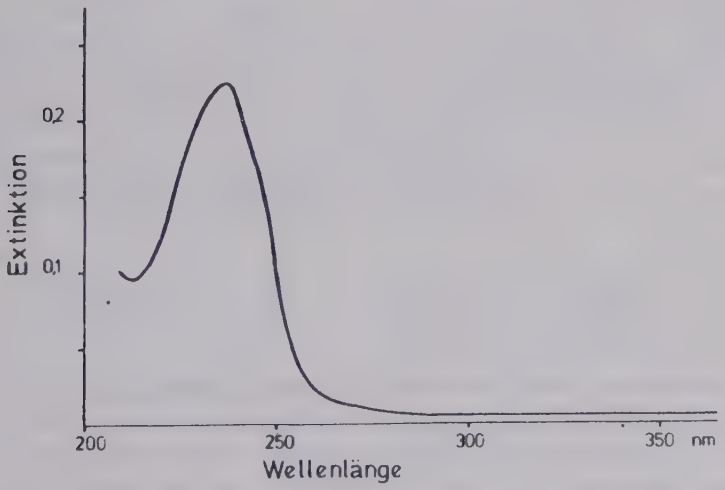


Abb. 5: UV-Spektrum der synthetisierten 15-Hydroperoxyeicosa-tetraensäure (3,4 mg/ml)

Ausbeute- und Reinheitsbestimmung der gereinigten 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure:

1. Präparation (eingesetzt 400 µMol Arachidonsäure):
Gewicht des gereinigten Produkts: 62,8 mg
gelöst in Ethanol (10 mg/ml)
Gehalt an Hydroperoxyeicosatetraensäure aus der Bestimmung der Extinktion bei 236 nm (ε = 25 000 $M^{-1}cm^{-1}$, siehe #20):
26,4 µMol/ml = 8,9 mg HPETE/ml
entspricht einer Reinheit von 89 Prozent bezogen auf das Gewicht

2. Präparation (eingesetzt 200 µMol Arachidonsäure):
Gewicht des gereinigten Produkts: 31,1 mg
gelöst in Ethanol (4,47 mg/ml)
Gehalt an Hydroperoxyeicosatetraensäure aus der Bestimmung der Extinktion bei 236 nm:
12,6 µMol/ml = 4,23 mg HPETE/ml
entspricht einer Reinheit von 95 Prozent bezogen auf das Gewicht

Bei einer in unserem Labor in analoger Weise durchgeführten enzymatischen Peroxidation von Arachidonsäure mit Lipoxidase konnte durch massenspektrometrische Untersuchungen gezeigt werden, daß unter den beschriebenen Bedingungen als Hauptprodukt 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure neben geringen Mengen von 11-Hydroperoxyeicosatetraensäure entsteht (#189).

2.3. Versuche mit Erythrozyten

2.3.1. Erythrozyten-Präparation

Ein Liter frisches Rinderblut wurde zur Gerinnungshemmung mit 20 ml einer 150 mM Na-EDTA-Lösung versetzt und zur Sedimentation der Erythrozyten viermal je fünf Minuten bei 1000 g zentrifugiert (Zentrifuge Optima BHG 600, 2000 upm). Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und durch die gleiche Menge einer 0,9-prozentigen Kochsalzlösung ersetzt. Zum Schluß wurde nochmals 15 Minuten zentrifugiert, der klare Überstand vollständig abgesaugt und die gepackten Erythrozyten mit dem vierfachen Volumen der Kochsalzlösung verdünnt. Die so erhaltene 20-prozentige Erythrozytenlösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert und innerhalb von vier Tagen verbraucht.

2.3.2. Inkubation der Erythrozyten mit Arachidonsäure bzw. 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

In Anlehnung an die Versuchsbedingungen von Roders et al.(#144) wurde die Erythrozyteninkubation in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen durchgeführt, in die nacheinander folgende Lösungen pipettiert wurden:

10 ml Puffer (0,05 M Natriumdihydrogenphosphat,
0,10 M Natriumchlorid;
mit Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt)
0,5 ml einer 0,15 M Na-EDTA-Lösung
5-40 µl einer ethanolischen Lösung von Arachidonsäure (3,6 mg/ml) bzw.
15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (8,9 mg/ml)
0,25 ml der 20-prozentigen Erythrozytenlösung

Die so entstandene Lösung mit einem Gesamtvolumen von 10,75 ml enthielt damit 0,465 Volumenprozent gepackte Erythrozyten; die Bestimmung der Osmolalität (siehe unten) ergab ohne den Zusatz von Ethanol einen Wert von 306 mOsmol/kg. Sofort nach der Zugabe der Erythrozyten wurde die Lösung 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

2.3.3. Untersuchung der osmotischen Fragilität der inkubierten Erythrozyten

Die osmotische Fragilität der Erythrozyten wurde direkt nach der Inkubation bestimmt, wozu jeweils 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,5 ml und 3,0 ml der Inkubationslösung in einem Zentrifugenröhrchen mit Aqua bidest auf ein Volumen von insgesamt 3,0 ml verdünnt wurden. Nach 10-minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurden die nicht hämolysierten Erythrozyten abzentrifugiert (Hettich-Zentrifuge Rotina S, 5 Minuten bei 2 000 upm), anschließend wurde im Überstand die Osmolalität (Knauer-Osmometer, Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung) und als Maß für die Hämolyse die Extinktion bei 542 nm (Photometer Zeiss PMQ II) bestimmt.

Der Hämolysegrad in den einzelnen Ansätzen konnte daraus unter Berücksichtigung der entsprechenden Verdünnungsverhältnisse berechnet werden; als Bezugsgröße diente der Ansatz mit der stärksten Verdünnung (0,5 ml Inkubat + 2,5 ml Aqua bidest), bei welchem eine vollständige Hämolyse eingetreten war (100 %). Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für menschliches Hämoglobin, $\varepsilon_{542nm} = 14{,}4\ mM^{-1}cm^{-1}$ (#185), ließ sich

daraus auch die Gesamtmenge an Hämoglobin im Inkubationsansatz ermitteln.

2.3.4. Methämoglobin - Bestimmung

Die bei der Inkubation von Erythrozyten mit 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure aufgetretene Methämoglobin-Bildung wurde nach der Cyanid-Methode (#4) bestimmt. Nach der Inkubation wurden von jedem Ansatz 2 x 5 ml zur Sedimentation der Erythrozyten zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge Rotina S, 5 Minuten bei 2 000 upm), der Überstand abgehoben und die Erythrozyten anschließend durch Zugabe einer verdünnten Pufferlösung (1 Vol. Inkubationspuffer + 4 Vol. Aqua bidest) auf das ursprüngliche Volumen von 5 ml gebracht, wobei vollständige Hämolyse eintrat.

Methämoglobin enthält an der sechsten Koordinationsstelle des Eisens als Liganden in alkalischem Milieu OH^--Ionen, im saurem Bereich dagegen H_2O-Moleküle (#92); bei pH 7,4 liegt eine Mischung beider Formen vor. Da zur Methämoglobin-Bestimmung die Absorption bei 630 nm benützt wird, bei der nur der H_2O-haltige Komplex ein Extinktionsmaximum besitzt (α-Bande), muß die Messung bei einem pH-Wert unter 7 durchgeführt werden. Daher wurde zu den 5 ml der hämolysierten Probe 1,25 ml eines 1 M Phosphat-Puffers mit einem pH-Wert von 6 zugefügt.

Für die photometrische Bestimmung wurden in 4 Halbmikroküvetten folgende Lösungen pipettiert und anschließend die Extinktion bei 630 nm gemessen (Photometer Zeiss, PMQ II):

Küvette Nr.	Probe Hämolysat pH 6	Wasser	$K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung (0,5g/10ml)	KCN-Lösung (0,5g/10ml)	Extinktion bei 630 nm
1	1,0 ml	20 µl	---	---	E_1
2	1,0 ml	10 µl	---	10 µl	E_2
3	1,0 ml	10 µl	10 µl	---	E_3
4	1,0 ml	---	10 µl	10 µl	E_4

Durch den Zusatz von Kaliumcyanid wird Methämoglobin-H_2O in Cyano-Methämoglobin überführt, das bei 630 nm wie Oxyhämoglobin nur eine sehr geringe Extinktion aufweist. Der $K_3[Fe(CN)_6]$-Zusatz bewirkt die vollständige Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin. Der prozentuale Methämoglobin-Gehalt läßt sich demnach aus den Extinktionen bei 630 nm

nach folgender Formel berechnen:

$(E_1 - E_2):(E_3 - E_4) \times 100$ = Prozent Methämoglobin in der Probe.

Cyano-Methämoglobin besitzt ein Extinktionsmaximum bei 543 nm (α-Bande). Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für menschliches Cyano-Methämoglobin, ε_{543} = 11,1 $mM^{-1}cm^{-1}$ (#185), läßt sich aus der Extinktion bei 543 nm in Küvette Nr. 4 die Gesamtkonzentration an Cyano-Methämoglobin berechnen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsverhältnisses kann damit die ursprüngliche Hämoglobin-Konzentration und über den prozentualen Methämoglobin-Gehalt auch die absolute Menge an gebildetem Methämoglobin bestimmt werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Methämoglobin-Bildung von zuvor hämolysierten Erythrozyten bei der Inkubation mit 15-Hydroperoxy-eicosatetraensäure gemessen. Dazu wurde zur Inkubation eine hypotone Pufferlösung (10 mM Natriumdihydrogenphosphat, 20 mM Natriumchlorid, pH 7,4) verwendet, die gegenüber der normalen Pufferlösung fünffach verdünnt war. Dabei trat innerhalb weniger Minuten eine vollständige Hämolyse ein; ansonsten wurde die Inkubation wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Methämoglobin-Bestimmung dieser Proben entfiel der Zentrifugationsschritt; nach der Inkubation wurden von jeder Probe 2 x 5 ml mit je 1,25 ml eines 1 M Phosphat-Puffers (pH 6) angesäuert und darin der Methämoglobin-Gehalt wie oben gemessen.

2.4. Versuche mit Rattenlebermikrosomen

2.4.1. Mikrosomenpräparation

2.4.1.1. Tiere

Lebermikrosomen wurden aus männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 300 und 500 g isoliert. Die Ratten wurden als Jungtiere von der Versuchstierzuchtanstalt Ivanovas, Kisslegg im Allgäu, bezogen und bis zur Verwendung mit Standard-Diät (Altromin, Lage) und Leitungswasser ad libitum ernährt.

2.4.1.2. Vorbehandlung der Tiere

Die für die Studien mit radioaktivem Tetrachlormethan verwendeten Lebermikrosomen stammten von Tieren, die zur Induktion des mischfunktionellen Oxygenase-Systems mit Phenobarbital vorbehandelt wurden (#57):

Nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion von Phenobarbital (Phenobarbital-Natrium, Lösung von 80 mg/ml Leitungswasser, Dosierung 80 mg/kg Körpergewicht) erhielten die Tiere in den darauffolgenden fünf Tagen Phenobarbital im Trinkwasser in 0,1-prozentiger Lösung. Nach dem Absetzen der Phenobarbitalbehandlung wurden die Tiere 24 Stunden nüchtern gehalten (Trinkwasser ad libitum) und dann getötet.

2.4.1.3. Gewinnung der Mikrosomen

Die Präparation der Lebermikrosomen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Remmer et al. (#139) durch fraktionierte Zentrifugation:

Die Tiere werden durch Genickschlag getötet und dekapitiert. Nach dem Ausbluten werden die Lebern entnommen, sofort in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt und gewogen und mit einer Schere zerkleinert. Zur Entfernung von Blutresten wird die Kochsalzlösung zweimal gewechselt. Dann werden die zerkleinerten Leberteile mit der 6,5-fachen Menge an Homogenisationsmedium im Potter-Homogenisator (Braun, Melsungen) unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenisat wird 10 Minuten mit ca. 7 000 g bei 0°C zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge RC2-B, Rotor SS 34, 10 000 upm). Aus dem erhaltenen Überstand werden die Mikrosomen durch Zentrifugation bei 105 000 g sedimentiert (Beckman-Ultrazentrifuge Spinco L-50, Rotor Ti 30, 30 000 upm, 0°C, 60 Minuten). Zur weiteren Reinigung werden die Mikrosomen in KCl-Tris-Puffer resuspendiert und nochmals wie oben zentrifugiert. Anschließend werden sie mit KCl-Tris-Puffer so verdünnt, daß 1 ml die Mikrosomen aus ca. 0,5 g Lebergewebe enthält. Diese Lösung wird bei -80°C maximal sechs Wochen bis zur Verwendung gelagert.

Lösungen:

Homogenisationsmedium:

0,25 M Saccharose
1 mM Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (Na-EDTA)
20 mM Tris-HCl
auf pH 7,4 eingestellt

KCl-Tris-Puffer:

120 mM KCl
50 mM Tris-HCl
auf pH 7,4 eingestellt

2.4.2. Bestimmung mikrosomaler Proteine

2.4.2.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den Mikrosomen erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (#91) gemäß folgender Vorschrift:

Zu 0,2 ml einer mikrosomalen Proteinlösung, die so verdünnt sein soll, daß sie 0,1 bis 0,5 mg Protein pro ml enthält, werden 0,2 ml 1 N NaOH und 2 ml alkalisches Kupferreagenz zugesetzt und geschüttelt. Nach 10 Minuten werden 0,2 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, das unmittelbar vor der Verwendung 1:1 mit Aqua dest. verdünnt wird, zugegeben und sofort geschüttelt. Nach 30 Minuten wird die Extinktion des Ansatzes bei 720 nm gegen einen nach derselben Methode behandelten Leerwert gemessen (Photometer Zeiss, PMQ II).

Für jede Bestimmungsreihe wird mit Rinderserumalbumin-Standards eine Eichkurve erstellt. Alkalisches Kupferreagenz wird unmittelbar vor der Verwendung aus den Lösungen I und II im Verhältnis 9:1 gemischt.

Lösung I: 2 % Na_2CO_3
0,028 % Seignettesalz
0,4 % NaOH

Lösung II: 0,1 % $CuSO_4 \times 5\ H_2O$

2.4.2.2. Bestimmung von Cytochrom P-450

Die Konzentration von Cytochrom P-450 in den Mikrosomen wurde nach der Methode von Omura und Sato (#113;#114) bestimmt:

Zur Messung werden je 2 ml der zu untersuchenden Mikrosomensuspension in der Proben- bzw. Referenzküvette mit einigen Körnchen Natriumdithionit reduziert. Nach Registrierung der Basislinie im Bereich zwischen 390 und 500 nm wird die Probenküvette ca. eine Minute mit Kohlenmonoxid begast und anschließend im gleichen Wellenlängenbereich das Differenzspektrum aufgenommen. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm läßt sich die Konzentration des Cytochroms P-450 unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von $91 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$ berechnen.

Die durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure verursachte Cytochrom P-450-Zerstörung (siehe 2.4.4.) kann auch direkt dadurch bestimmt werden, daß ein Differenzspektrum der Mikrosomensuspension, die mit dem Hydroperoxid behandelt worden ist (Probenküvette), gegen die ansonsten gleich behandelte, aber Hydroperoxid-freie Mikrosomensuspension (Referenzküvette) aufgenommen wird, nachdem beide Küvetten mit Natriumdithionit reduziert

und mit Kohlenmonoxid gesättigt worden sind. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm kann damit direkt der Unterschied der Cytochrom P-450 - Konzentration in beiden Küvetten berechnet werden.

2.4.2.3. Bestimmung von Cytochrom P-420

Cytochrom P-450 kann unter bestimmten Umständen, z.B. durch den Einfluß von Detergentien oder Proteasen, in eine enzymatisch inaktive Form, das sogenannte Cytochrom P-420 umgewandelt werden. Der Kohlenmonoxid-Komplex dieses inaktivierten Cytochroms weist im reduzierten Zustand eine Soret-Bande mit einem Extinktionsmaximum bei 420 nm auf.

Der Anteil an Cytochrom P-420 in den Mikrosomensuspensionen wurde nach dem Verfahren von Nishibayashi und Sato (#108) bestimmt:

Aus dem Differenzspektrum (reduzierte, Kohlenmonoxid-gesättigte gegen reduzierte Probe) wird zunächst wie beschrieben der Cytochrom P-450-Gehalt berechnet; Cytochrom P-420 stört bei dieser Bestimmung nicht. Daraus wird die theoretische Extinktion von reinem Cytochrom P-450 in der Probe bei 420 nm errechnet ($\varepsilon_{420-450nm} = -41 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$ für reines Cytochrom P-450). Aus der Differenz der tatsächlich gemessenen und der berechneten Extinktion bei 420 nm läßt sich damit die Cytochrom P-420-Konzentration unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{420nm} = 110 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$ für Cytochrom P-420 berechnen.

2.4.2.4. Bestimmung von Cytochrom b_5

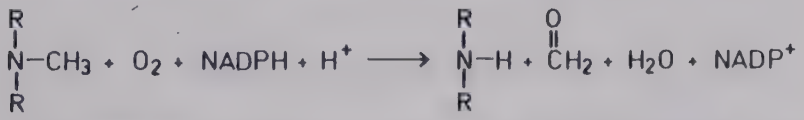
Cytochrom b_5 kann in Mikrosomen in Gegenwart von Cytochrom P-450 selektiv bestimmt werden, da es im Unterschied zum Cytochrom P-450 mit NADH leicht reduziert werden kann. Im Differenzspektrum einer mit NADH reduzierten gegenüber einer oxidierten Mikrosomenprobe wird daher nur das Cytochrom b_5 erfaßt (#41).

Mit der oxidierten Probe (2,5 ml in Proben- und Referenzküvette) nimmt man im Bereich zwischen 390 und 500 nm zuerst die Basislinie auf, nach Zugabe von 5 µl einer 30 mM NADH-Lösung zur Probenküvette wird im gleichen Wellenlängenbereich das Differenzspektrum registriert. Für die Berechnung der Cytochrom b_5 - Konzentration verwendet man den molaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{426-409nm} = 185 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$.

Alle differenzspektroskopischen Messungen wurden mit einem Spektrophotometer (PYE Unicam SP 1800) mit Schreiberzusatz durchgeführt. Die Scan-Geschwindigkeit betrug 1 nm/sec, der Lichtweg in den verwendeten Glas-Küvetten 1 cm.

2.4.3. Untersuchung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung

Eine bekannte Reaktion, die durch das mikrosomale Monooxygenase-System katalysiert wird, ist die oxidative N-Demethylierung sekundärer und tertiärer Amine (#28):



Diese Reaktion wird häufig zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Monooxygenase-Systems benützt, da der dabei gebildete Formaldehyd nach der Methode von Nash (#104;#187) photometrisch bestimmt werden kann. Aus diesem Grunde wurde diese Reaktion für die Untersuchung der Hemmung des Monooxygenase-Systems durch Arachidonsäure bzw. 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure herangezogen. Als geeignetes Substrat für die oxidative N-Demethylierung wurde Ethylmorphin, ein tertiäres Amin, verwendet.

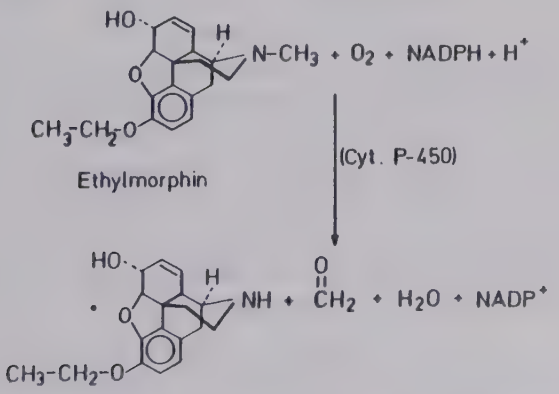


Abb. 6: Oxidative Ethylmorphin-Demethylierung in Mikrosomen

2.4.3.1. Inkubation mit Ethylmorphin

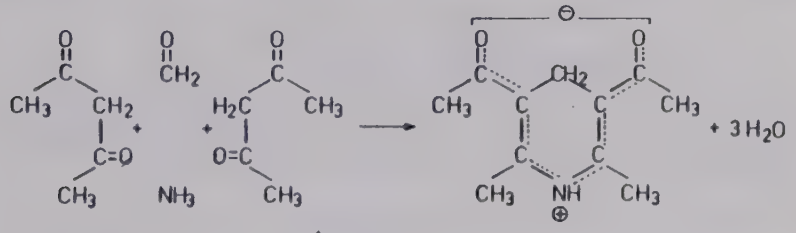
Zur Untersuchung der Kinetik der Ethylmorphin-Demethylierung wurden Mikrosomen in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ethylmorphin in 25ml-Erlenmeyer-Kölbchen bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsansätze (Endvolumen 2,5 ml) enthielten im einzelnen:

	Endkonzentration im Inkubat
0,5 ml Mikrosomensuspension (6,42 mg Protein pro ml Puffer)	1,28 mg Protein/ml
0,2 ml D,L-Isocitratlösung (100 µMol pro ml Puffer)	8 mM
0,2 ml NADP-Isocitratdehydrogenase-Lösung	
(12,5 µMol NADP	1 mM
+ 625 µg Isocitratdehydrogenase/ml Puffer)	50 µg/ml
Ethylmorphin-Lösung (2,5 µMol pro ml Puffer)	
a) 0 µl	0,0 mM
b) 100 µl	0,1 mM
c) 200 µl	0,2 mM
d) 500 µl	0,5 mM
e) 1000 µl	1,0 mM
Pufferlösung pH 7,5 ad 2,5 ml aufgefüllt	
50 mM Tris-HCl	50 mM
120 mM KCl	120 mM
5 mM $MgCl_2$	5 mM

Die Reaktion wurde nach 10 Minuten Vorinkubation bei 37°C im Wasserbad durch die Zugabe der NADP-Isocitratdehydrogenase-Lösung gestartet. Zur Formaldehydbestimmung wurden direkt nach dem Start (0-Minuten-Wert) und 20 Minuten später je 1 ml Inkubationslösung entnommen und zum Stop der Umsetzung mit je 1 ml 12,5-prozentiger Trichloressigsäure-Lösung versetzt. Bei den Hemmversuchen mit Arachidonsäure bzw. 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure wurden unterschiedliche Mengen dieser Substanzen, gelöst in Ethanol, vor der Inkubation in die Reaktionsgefäße gegeben, das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft und erst dann die Inkubationslösung wie beschrieben zugesetzt.

2.4.3.2. Formaldehydbestimmung

Die Konzentration des entstandenen Formaldehyds wurde nach der Methode von Nash bestimmt (#187). Diese Bestimmungsmethode beruht auf der Kondensation von Formaldehyd mit Acetylaceton in Gegenwart von Ammoniak zum entsprechenden Dihydrolutidinderivat (Hantzsch-Synthese):



2 Acetylaceton
+ 1 Ammoniak
+ 1 Formaldehyd
⟶ 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin + 3Wasser

Abb. 7: Reaktion von Formaldehyd zu 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin

Acetylaceton und Ammoniak müssen im Überschuß vorliegen, das pH-Optimum der Reaktion liegt bei pH 6. Das gebildete 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin besitzt ein Absorptionsmaximum bei 412 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 8000 $M^{-1}cm^{-1}$ und ist mehrere Stunden stabil.

Ausführung:

1 ml Probe (Inkubationslösung bzw. Formaldehyd-Verdünnungsreihe) wird zur Proteinfällung mit 1 ml 12,5-prozentiger Trichloressigsäure versetzt und nach 20-minütigem Stehenlassen in der Kälte zentrifugiert (5 Minuten bei 2500 upm, Tischzentrifuge Hettich, Rotina S). Vom klaren Überstand wird 1 ml mit der gleichen Menge der Nash-Reagenzlösung gemischt und 12 Minuten bei 60°C im Wasserbad erhitzt. Nachdem die Proben auf Zimmertemperatur abgekühlt sind, wird die Extinktion bei 412 nm gegen Wasser als Leerwert gemessen (Zeiss Spektrophotometer PMQ II).

Mit einer Verdünnungsreihe von Formaldehyd mit Inkubationspuffer wurde eine Eichkurve erstellt; diese war bis zu einer Extinktion von 0,6 OD linear. Der Zusatz von Ethylmorphin (1mM) oder Mikrosomen (0,87 mg Prot./ml) hatte keinen Einfluß auf die Steigung der Eichgeraden.

Nash-Reagenz:

150 g Ammoniumacetat,
2 ml Acetylaceton,
3 ml Essigsäure
werden mit Aqua dest. in 500 ml gelöst und auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.

2.4.3.3. Kinetische Analyse der Meßergebnisse

Enzymatische Reaktionen gehorchen, sofern es sich um Ein-Substrat-Reaktionen handelt bzw. wenn Cosubstrate oder Coenzyme in Sättigungskonzentrationen vorliegen, häufig der Michaelis-Menten-Beziehung:

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

V_{max} und K_m sind für das jeweilige Enzym bei einem bestimmten Substrat charakteristische Größen. Sie werden normalerweise dadurch bestimmt, daß bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten gemessen werden; V_{max} und K_m werden dann meist durch graphische Auftragung dieser Meßgrößen nach Lineweaver und Burk (linearisierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung) ermittelt. Voraussetzung für diese Methode ist aber, daß die initiale Reaktionsgeschwindigkeit mit hinreichender Genauigkeit gemessen werden kann, wobei die Substratkonzentration im Meßzeitraum nicht mehr als fünf Prozent abnehmen soll.

Diese Voraussetzung war in unserem Fall jedoch nicht gegeben; insbesondere bei der ungehemmten Ethylmorphin-Demethylierung nahm die Substratkonzentration während der 20-minütigen Inkubationsdauer stark ab (maximal bis zu 50 Prozent). Diese lange Inkubationsdauer war aber notwendig, um auch bei kleinen Substratkonzentrationen bzw. bei Hemmung der Reaktion eine für die Messung ausreichend große Formaldehydkonzentration zu erhalten. Falls wie im vorliegenden Fall das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion weit genug auf der Seite des Produkts liegt und das Produkt eine wesentlich geringere Affinität zum Enzym besitzt als das Substrat, kann für die kinetische Analyse die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung verwendet werden (#155):

$$V_{max} \times t = K_m \times \ln \frac{[S_o]}{[S_o]-[P]} + [P]$$

$[S_o]$ = Anfangskonzentration des Substrats zur Zeit t = 0
$[P]$ = Konzentration des Produkts zur Zeit t

Zur graphischen Ermittlung von V_{max} bzw. K_m läßt sich diese Gleichung umformen:

$$\frac{\ln \frac{[S_o]}{[S_o]-[P]}}{t} = -\frac{1}{K_m} \times \frac{[P]}{t} + \frac{V_{max}}{K_m}$$

Trägt man $\frac{\ln \frac{[S_o]}{[S_o]-[P]}}{t}$ gegen $\frac{[P]}{t}$ auf, so erhält man im Falle einer Michaelis-Menten-Kinetik eine Gerade mit der Steigung $-1/K_m$, einem Schnittpunkt mit der y-Achse vom Betrag V_{max}/K_m und einem Schnittpunkt mit der x-Achse mit dem Betrag V_{max}.

2.4.4. Inkubation von Mikrosomen mit 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure bzw. ihrer thermischen Zerfallsprodukte

Zur Untersuchung der Zerstörung mikrosomaler Cytochrome durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure bzw. ihrer thermischen Zerfallsprodukte wurden Mikrosomen mit Tris-KCl-Puffer (Tris-HCl 50 mM, KCl 120 mM, pH 7,5) auf einen Proteingehalt von etwa 1 mg/ml verdünnt und 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Nach Bestimmung der Anfangskonzentration der Cytochrome wurden jeweils 10 ml der Mikrosomenlösung in Erlenmeyer-Kölbchen überführt, in die zuvor unterschiedliche Mengen des Hydroperoxids bzw. seiner thermischen Zerfallsprodukte pipettiert worden waren; das Lösungsmittel Ethanol wurde vor der Mikrosomenzugabe mit Stickstoff abgeblasen. Die Erlenmeyer-Kölbchen wurden bei der weiteren Inkubation im Wasserbad bei 37°C leicht geschüttelt; nach entsprechenden Zeitintervallen wurden jeweils 2 ml der Mikrosomenlösung entnommen und auf ihren Cytochromgehalt gegenüber einer Kontrollinkubation, die kein Hydroperoxid enthielt, untersucht (siehe 2.4.2.).

Zur thermischen Zersetzung der 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure wurden 500 nMol dieser Substanz in 1 ml Ethanol 10 Minuten bei 80°C in einem verschlossenen Reagenzglas erhitzt.

2.4.5. Geschlossenes Inkubationssystem für Mikrosomen zur Dampfraum-Analyse von Alkanen und chlorierten Kohlenwasserstoffen

Zur Untersuchung der mikrosomalen Metabolisierung von Tetrachlormethan unter hypoxischen Bedingungen mußte ein Inkubationssystem entwickelt werden, das folgende Anforderungen erfüllt:

- Möglichkeit zur Inkubation von Mikrosomen mit Tetrachlormethan unter weitgehendem Ausschluß von Sauerstoff,
- Möglichkeit zur Messung der Metabolisierung von Tetrachlormethan bzw. der Bildung des Metaboliten Trichlormethan,
- Möglichkeit zur Messung von Alkanen, die als Zerfallsprodukte von polyungesättigten Fettsäuren entstehen können.

Zu diesem Zweck wurde das von H. Dürk (#38) entwickelte System für in-vivo-Studien der CCl_4-Metabolisierung für unsere Zwecke abgewandelt (siehe Abb. 8). Es handelt sich dabei um ein Inkubationssystem mit geschlossenem Gaskreislauf, aus dem der Sauerstoff durch vorhergehende Spülung mit Stickstoff entfernt werden kann. Die Messung der CCl_4-Metabolisierung, der $CHCl_3$-Bildung und der Alkanfreisetzung erfolgt durch Dampfraum-Analyse über ein im Gaskreislauf integriertes Probenentnahmesystem. Eine Membranpumpe sorgt für den Gastransport und damit gleichzeitig für die Durchmischung der Gasphase.

Im einzelnen ist das System folgendermaßen konstruiert: Als Inkubationsgefäß für die Mikrosomen dient ein 100-ml-Rundkolben (1) mit 3 verschiedenen Anschlüssen. Auf den mittleren Anschluß, eine Normschliff-Hülse (2), ist ein 15 cm langer Liebig-Kühler (3) aufgesetzt, der mit Leitungswasser gekühlt wird, um Wasserdampf, der aus dem Inkubationssystem mitgerissen wird, wieder zu kondensieren. Am oberen Ende des Kühlers ist über eine Glas/Edelstahl-Schliffverbindung (4) eine 1/8 Zoll starke Edelstahlkapillare (5) angeschlossen, die zunächst zur Membranpumpe (6) und dann weiter zu dem automatischen Gasprobenentnahmesystem (7) führt. Das Ende der Kapillare ist mit einer Injektionsnadel (8) verlötet, die durch eine Teflonmembran im Quickfit-Schraubanschluß (9) des Inkubationskolbens gesteckt wird. Eine Begasung des Inkubationssystems mit Stickstoff oder synthetischer Luft ist über den Hahnanschluß (10) am Inkubationsgefäß möglich, wobei zur Gasableitung die Injektionsnadel (8) aus der Teflonmembran herausgezogen wird. Das Inkubationsgefäß kann mit dem thermostatisierten Wasserbad (11) temperiert werden. Ein Rührmagnet (12) sorgt für eine gleichmäßige Durchmischung der Inkubationslösung und für eine schnelle

Einstellung des Diffusionsgleichgewichts zwischen flüssiger und gasförmiger Phase.

Zur Dichtung der Schliffverbindungen wird Kapsenbergschmiere (#112) verwendet, um eine Diffusion der lipophilen chlorierten Kohlenwasserstoffe aus dem System zu verhindern. Das gesamte System hat ein Volumen von 150 ml.

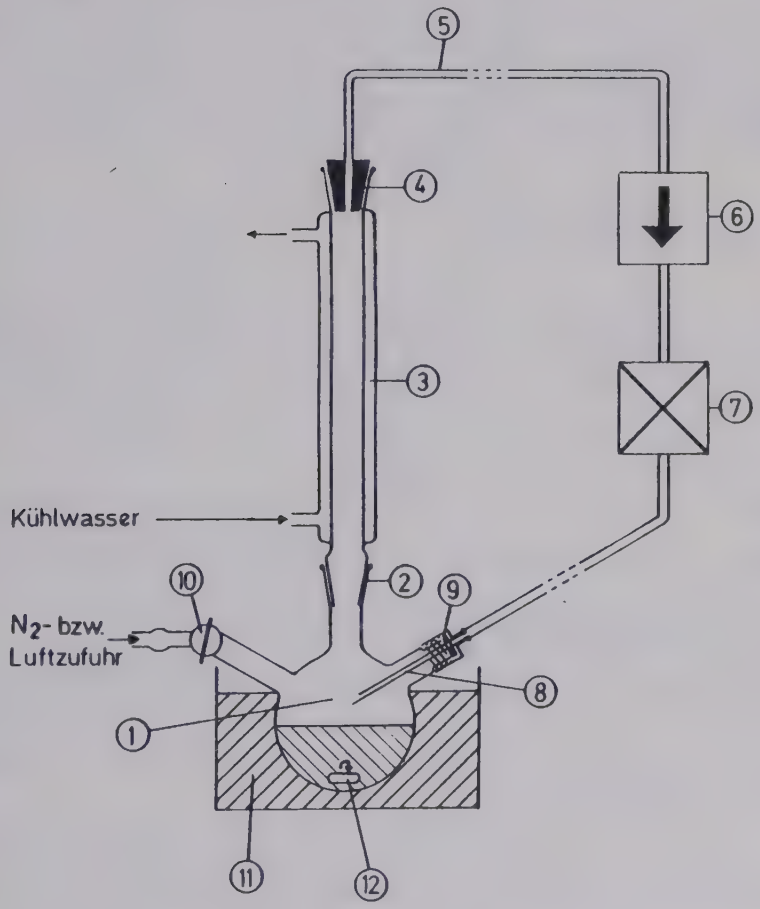


Abb. 8: Geschlossenes Inkubationssystem zur Dampfraum-Analyse flüchtiger Stoffwechselprodukte (Erklärung siehe Text)

2.4.5.1. Automatisches Probengebersystem zur Gasprobenentnahme für die Gaschromatographie

Das automatische Gasproben-Entnahmesystem besteht aus drei Multiport-Drehschieberventilen, die entsprechend Abbildung 9 über Edelstahlkapillaren (I.D. = 1 mm) untereinander bzw. mit den Gaschromatographen verbunden sind. Mit einem elektromechanischen Steuergerät (Firma Dani) können damit in beliebig wählbaren Zeitabständen Gasproben aus dem Inkubationssystem auf die Chromatographiesäulen aufgetragen werden. Die Umschaltung der Drehschieberventile erfolgt durch Preßluftimpulse, die über Magnetventile durch eine Zeitschaltuhr gesteuert werden können.

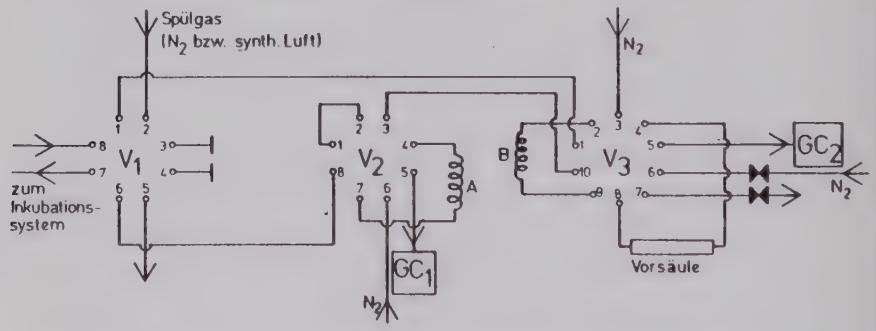


Abb. 9: Automatisches Gasproben-Entnahmesystem (Erklärung siehe Text)

Die einzelnen Drehschieberventile haben folgende Aufgaben:
Mit Ventil 1 können die beiden anderen Ventile vom Systemkreislauf abgekoppelt und ihre Probenschleifen mit Stickstoff bzw. synthetischer Luft gespült werden. Dieser Spülvorgang ist notwendig, um zu verhindern, daß Trägergas, das in den Probenschleifen unter starkem Überdruck steht, in den Systemkreislauf gelangt.

Ventil 2 mit der Probenschleife A (Volumen 180 µl) dient zur Entnahme von Gasproben für den Gaschromatographen 1, an dem die halogenierten Kohlenwasserstoffe Trichlor- und Tetrachlormethan gemessen werden.

Mit Ventil 3 werden über die Probenschleife B (Volumen 3,4 ml) Gasproben für den Gaschromatographen 2 zur Analyse der Alkane entnommen. Eine Vorsäule sorgt für die Abtrennung der chlorierten Kohlenwasserstoffe und anderer weniger flüchtigen Verbindungen, die die Alkanbestimmung stören würden; nach dem Durchbruch der Alkane wird die Vorsäule durch Ventil-

umschaltung mit Trägergas rückgespült. Eine zweite Trägergaszuleitung an Port 6 sorgt in dieser Zeit für die Stickstoffzufuhr zum Gaschromatographen. Der Trägergasdruck wird mit den beiden Nadelventilen so eingestellt, daß bei der Ventilumschaltung keine Druckschwankungen am Gaschromatographen auftreten.

Falls auf eine Analyse der Alkane verzichtet wird, kann Port 1 von Ventil 1 direkt mit Port 3 von Ventil 2 verbunden werden. Sollen dagegen nur Alkane gemessen werden, kann Ventil 2 durch eine direkte Verbindung zwischen Port 10 von Ventil 3 und Port 6 von Ventil 1 aus dem Systemkreislauf ausgekoppelt werden. Abbildung 10 zeigt den Schaltzyklus zur Probenentnahme für die gaschromatographische Analyse.

In Normalstellung werden beide Probenschleifen mit Gas aus dem Inkubationssystem durchspült; die Vorsäule am Gaschromatograph 2 befindet sich in Rückspülstellung.

Zur Injektion werden die Ventile 2 und 3 umgeschaltet, der Inhalt der Probenschleifen gelangt mit dem Trägergas auf die Trennsäulen, chlorierte Kohlenwasserstoffe werden von der Vorsäule des Gaschromatographen 2 zurückgehalten. Durch Umschalten von Ventil 1, und 2 Sekunden später von Ventil 2 und 3 werden die Probenschleifen gespült; gleichzeitig wird die Vorsäule zur Rückspülung wieder umgeschaltet. Nach der Spülung, die 28 Sekunden dauert, werden durch Umschaltung von Ventil 1 die Probenschleifen wieder an den Systemkreislauf angekoppelt.

Die Injektionszeit muß so gewählt werden, daß die Alkane aus der Probenschleife B in dieser Zeit die Vorsäule passiert haben, die chlorierten Kohlenwasserstoffe aber noch nicht. Unter den gegebenen Bedingungen (siehe 2.4.5.3.) war dies nach 1,5 Minuten der Fall.

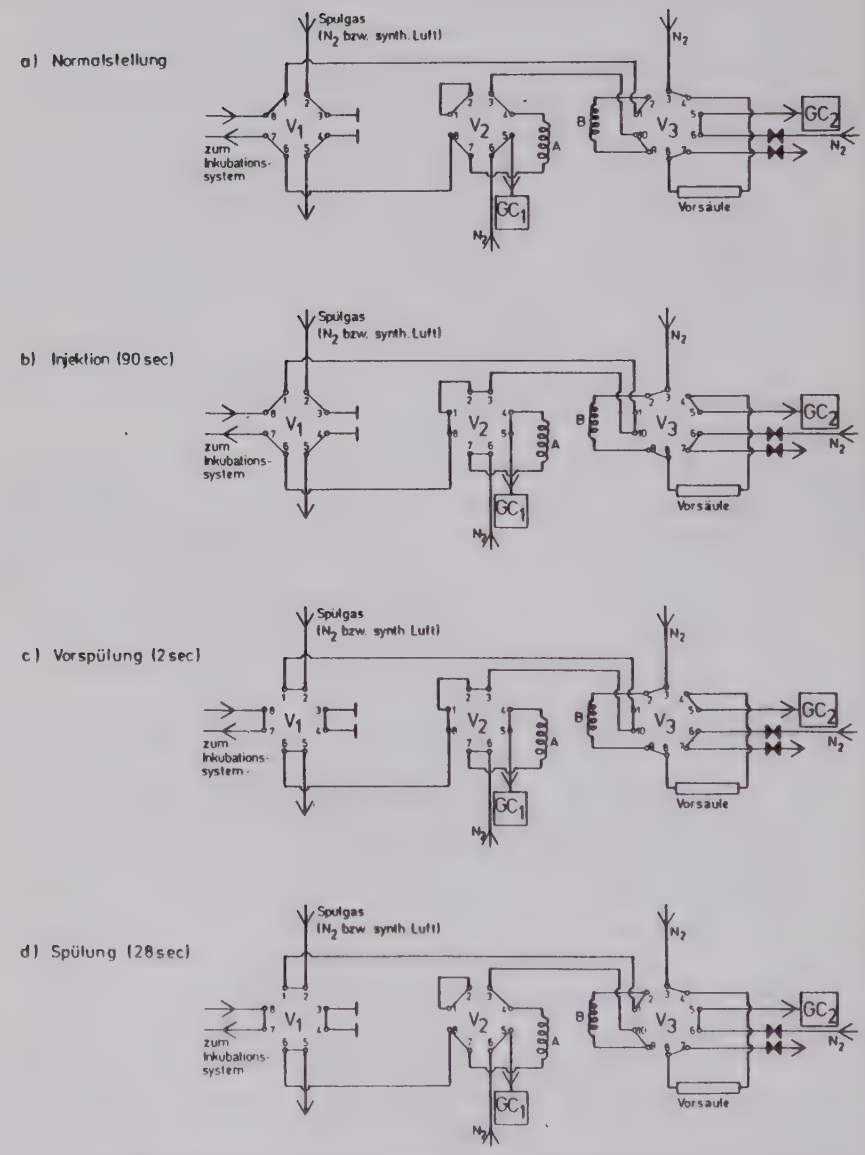


Abb. 10: Schaltzyklus des Probenentnahmesystems zur Analyse von chlorierten Kohlenwasserstoffen (an GC_1) und Alkanen (an GC_2)

2.4.5.2. Gaschromatographische Analyse von Trichlor- und Tetrachlormethan

Die über die Probenschleife A von Ventil 2 entnommene Gasprobe (180 µl) wurde gaschromatographisch auf den Gehalt an Trichlor- und Tetrachlormethan untersucht. Dazu wurde ein Gaschromatograph vom Typ Varian 1400 verwendet, der mit einer 2 Meter langen, 1/8 Zoll starken Stahlsäule, belegt mit 10 Prozent FFAP auf Chromosorb W 80-100, ausgerüstet war. FFAP (Free Fatty Acid Phase) ist ein Nitroterephthalsäure-Polyethylenglykol-Ester, das Molekulargewicht der Polyethylenglykolkette beträgt ca. 15000. Polare Substanzen werden auf diesem Trennmaterial stärker zurückgehalten als unpolare Verbindungen.

Die Analyse erfolgte isotherm bei einer Temperatur von 50°C, zur Detektion wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) benützt, der an einen Integrator (Hewlett-Packard, Nr. 3380 S) angeschlossen war. Als Trägergas wurde Stickstoff mit einer Durchflußrate von 17 ml/min verwendet, als Brenngase für den FID synthetische Luft (300 ml/min) und Wasserstoff (30 ml/min). Unter diesen Bedingungen betrug die Retentionszeit für Tetrachlormethan 2,7 Minuten, für Trichlormethan 6,4 Minuten (siehe Abb. 11).

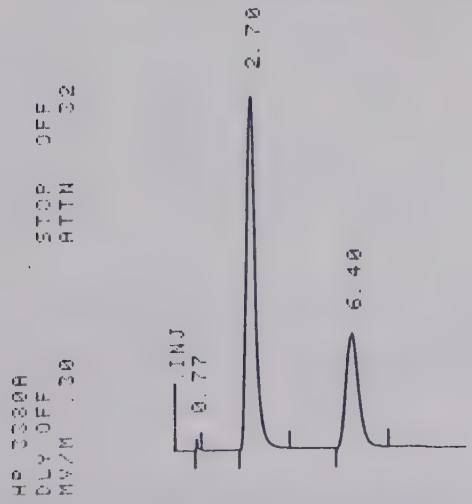


Abb. 11: Gaschromatographische Trennung von Tri- und Tetrachlormethan (Analysenbedingungen siehe Text)
RT 2,7 min: CCl_4 (18,7 µM bzw. 495 vpm)
RT 6,4 min: $CHCl_3$ (10,3 µM bzw. 272 vpm)

Vor jedem Versuch wurden mit definierten CCl_4- bzw. $CHCl_3$-Konzentrationen die stoffspezifischen Korrekturfaktoren dieser Substanzen bestimmt.

2.4.5.3. Gaschromatographische Analyse von Alkanen

Die Analyse der Alkane erfolgte in einem Gaschromatographen der Firma Carlo Erba, Modell Fractovap 2150. Das oben beschriebene Probenentnahmeventil 3 mit der Probenschleife B (3,4 ml) war zusammen mit der Vorsäule und der eigentlichen Trennsäule im Ofenraum des Gaschromatographen installiert. Als Vorsäule zur Abtrennung der chlorierten Kohlenwasserstoffe diente eine 3 Meter lange, 1/8 Zoll starke Stahlsäule, belegt mit 10 Prozent FFAP auf Chromosorb W 80-100 (siehe 2.4.5.2.). Die eigentliche Trennsäule bestand aus einer 5 Meter langen, 1/8 Zoll starken Stahlsäule, gepackt mit Porasil C. Dieses Packungsmaterial besteht aus sphärischen, porösen Silikatpolymeren mit einem Porendurchmesser von 200 bis 500 Angström. Die Trennwirkung beruht auf seiner Eigenschaft als Molekularsieb;

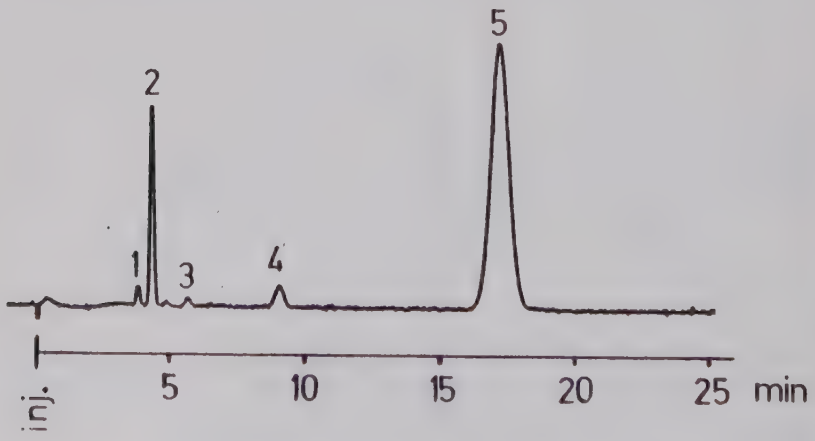


Abb. 12: Gaschromatographische Trennung von Alkanen
(Analysenbedingungen siehe Text)
1 = Methan, 2 = Ethan, 3 = Propan, 4 = n-Butan, 5 = n-Pentan
Die Abbildung zeigt die Analyse einer Gasprobe nach mikrosomaler Metabolisierung von Tetrachlormethan unter Stickstoff (siehe 3.4.3.)

zur Anfeuchtung des Kieselgelmaterials wurde das Trägergas durch einen Zylinder geleitet, der mit Natriumsulfat-Dekahydrat gefüllt war.

Die Analyse erfolgte isotherm bei 50°C und einem Trägergasstrom von 24,5 ml/min. Die Detektion der Alkane erfolgte mit einem FID, dessen Signale mit einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet wurden. Die maximale Empfindlichkeit des FID war bei einem Vordruck von 60 kPa für Wasserstoff und 140 kPa für synthetische Luft erreicht. Die Retentionszeiten betrugen unter diesen Bedingungen 4,3 Minuten für Ethan und 17,2 Minuten für Pentan (siehe Abb. 12). Die Auswertung erfolgte anhand der Peakhöhen durch Vergleich mit einem Eichgasgemisch bekannter Zusammensetzung.

2.4.6. Inkubation von Mikrosomen mit Tetrachlormethan unter Stickstoff

2.4.6.1. Inkubation im geschlossenen System

Die Inkubation von Mikrosomen mit Tetrachlormethan unter Stickstoff-Atmosphäre erfolgte in dem unter 2.4.5. beschriebenen geschlossenen Inkubationssystem. Die Mikrosomen wurden mit Pufferlösung (TRIS-HCl 50 mM, KCl 120 mM, $MgCl_2$ 5 mM, pH 7,5) zu einem Gehalt von 2 mg Protein pro ml verdünnt, der Lösung wurden Natriumisocitrat (8 mM) und Isocitratdehydrogenase (50 µg/ml) zugesetzt. Von dieser Lösung wurden zwischen 15 und 25 ml in das Inkubationsgefäß gegeben, mit Stickstoff gespült und auf 0°C gekühlt. Nach etwa 30 Minuten wurde das Thermostatisierbad auf 37°C aufgeheizt und unter weiterer Stickstoffbegasung 5 ml der Mikrosomenlösung aus dem Inkubationsgefäß zur Bestimmung der Anfangskonzentrationen von Cytochrom P-450 (2.4.2.2.), Malonaldehyd (2.4.8.) bzw. für die Lipidanalyse (2.5.) entnommen.

Nach weiteren 10 Minuten Stickstoffspülung wurde das Inkubationssystem verschlossen und über das Septum mit einer gasdichten Glasspritze eine definierte Menge eines Tetrachlormethan-Stickstoff-Gemisches zugegeben. Dieses Tetrachlormethan-Stickstoff-Gemisch stammte aus einer Bördelkappen-Ampulle, die etwa zur Hälfte mit Tetrachlormethan gefüllt und anschließend mit Stickstoff gespült worden war. Im Gasraum dieses Gefäßes stellt sich entsprechend der Umgebungstemperatur ein definierter Dampfdruck von Tetrachlormethan ein, der über die Clausius-Clapeyronsche Gleichung aus den bekannten Dampfdrücken von Tetrachlormethan bei 20 bzw. 30°C (91 bzw. 143 Torr; siehe #8) graphisch bestimmt werden kann. Die zugegebene CCl_4-Menge $n_{CCl_4 inj}$ kann bei bekanntem Injektionsvolumen V_{inj} mit Hilfe

der allgemeinen Gasgleichung berechnet werden:

$$n_{CCl_4 inj} = \frac{p \times V_{inj}}{R \times T}$$

Sollten im Inkubationssystem CCl_4-Konzentrationen erreicht werden, die eine Zugabe von mehr als 1 ml des CCl_4-Stickstoff-Gemisches erfordert hätte, wurde Tetrachlormethan in flüssiger Form injiziert. Die zugegebene CCl_4-Menge läßt sich dabei aus dem injizierten Flüssigkeitsvolumen über die spezifische Dichte von Tetrachlormethan berechnen:

$$n = \frac{V_{fl} \times D}{MG}$$

$D_{20°C}$ für CCl_4 = 1,59 g/ml
MG von CCl_4 = 154 g/Mol

Nach 10 Minuten zur Einstellung der Gleichgewichtskonzentration von Tetrachlormethan zwischen Gas- und Flüssigkeitsphase wurde die Metabolisierung durch Zugabe von NADP gestartet. Pro ml Inkubationslösung wurden dazu mit einer Glasspritze 10 µl einer 100 mM NADP-Lösung injiziert, die ebenfalls mit Stickstoff gespült worden war; die NADP-Konzentration im Inkubat betrug demnach 1 mM.

Während der Inkubation wurden in zehn- bis fünfundzwanzigminütigen Abständen mit dem automatischen Entnahmesystem Gasproben zur Bestimmung der chlorierten Kohlenwasserstoffe bzw. der Alkane entnommen.

Die Inkubation wurde beendet, indem das Inkubationsgefäß mit Eis gekühlt und überschüssiges Tetrachlormethan durch Spülen mit Stickstoff entfernt wurde. Die für die Malonaldehydbestimmung entnommene Mikrosomenprobe wurde durch Zugabe der Thiobarbitursäure-Reagenzlösung sofort denaturiert (siehe 2.4.7.), die zur Lipidextraktion entnommene Mikrosomenproben sofort mit Methanol versetzt (siehe 2.5.1.). Die Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehalts wurde dagegen erst nach zehnminütiger Stickstoffbegasung durchgeführt, da Tetrachlormethan die Bestimmung dieses Cytochroms beeinflußt (#136).

2.4.6.1.1. Berechnung der Tetrachlormethan-Metabolisierung

Die durch das mikrosomale Enzymsystem metabolisierte CCl_4-Menge läßt sich über die Abnahme der CCl_4-Konzentration im Gasraum des Inkubationssystems bestimmen. Entsprechend der Löslichkeit von Tetrachlormethan in der Mikrosomensuspension stellt sich zwischen der Gasphase und der Flüssigkeit ein

Gleichgewicht der CCl_4-Konzentration ein, das durch den Verteilungskoeffizient K_{CCl_4} beschrieben werden kann:

$$K_{CCl_4} = \frac{c_{fl}}{c_{gas}} \quad \text{bzw.} \quad c_{fl} = K_{CCl_4} \times c_{gas} \qquad (I)$$

c_{fl} = Konzentration von CCl_4 in der Mikrosomenlösung
c_{gas} = Konzentration von CCl_4 in der Gasphase

Wird nun Tetrachlormethan durch die Mikrosomen metabolisiert und dadurch aus der Flüssigkeit entfernt, muß zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsgleichgewichts Tetrachlormethan aus der Gasphase nachgeliefert werden, d.h. die Konzentration von Tetrachlormethan in der Gasphase sinkt entsprechend ab. Ist der Verteilungskoeffizient bekannt, kann aus der Konzentrationsänderung im Gasraum die metabolisierte Menge berechnet werden, sofern auch die Volumina der Gasphase und der Flüssigkeit bekannt sind. Die Gesamtmenge n_{CCl_4} von Tetrachlormethan im System setzt sich aus den beiden Anteilen zusammen:

$$n_{CCl_4} = V_{fl} \times c_{fl} + V_{gas} \times c_{gas} \qquad (II)$$

$V_{fl} \times c_{fl}$: in Mikrosomen gelöstes CCl_4
$V_{gas} \times c_{gas}$: gasförmiges CCl_4

bzw. unter Verwendung von Gleichung (I):

$$n_{CCl_4} = (V_{fl} \times K_{CCl_4} + V_{gas}) \times c_{gas} \qquad (III)$$

Der Ausdruck $(V_{fl} \times K_{CCl_4} + V_{gas})$ wird auch als imaginäres Verteilungsvolumen V_i bezeichnet. Gleichung (III) vereinfacht sich damit zu

$$n_{CCl_4} = V_i \times c_{gas} \qquad (IV)$$

Da dieses imaginäre Verteilungsvolumen während der Metabolisierung von Tetrachlormethan konstant bleibt, läßt sich die metabolisierte Menge an Tetrachlormethan bei bekanntem V_i direkt aus der Konzentrationsänderung im Gasraum berechnen:

$$\Delta n = V_i \times \Delta c_{gas} = (V_{fl} \times K_{CCl_4} + V_{gas}) \times \Delta c_{gas} \qquad (V)$$

Δn = metabolisierte Menge CCl_4
Δc_{gas} = Änderung der CCl_4-Konzentration im Gasraum

Allerdings muß bei dieser Berechnung noch berücksichtigt werden, daß für jede Konzentrationsbestimmung durch das automatische Probenentnahmesystem ein bestimmter Anteil an gasförmigen Tetrachlormethan entnommen

und beim Injektions- und Spülzyklus durch reinen Stickstoff ersetzt wird. Bei einem gegebenen Entnahmevolumen V_e werden zwischen zwei aufeinanderfolgenden Konzentrationsbestimmungen durch die erste Messung die Menge $n_e = V_e \times c_{gas(1)}$ durch den Ventilschaltzyklus aus dem System entfernt. Die bis zur zweiten Messung metabolisierte CCl_4-Menge Δn_{met} bestimmt sich damit zu

$$\Delta n_{met} = V_i \times (c_{gas(1)} - c_{gas(2)}) - V_e \times c_{gas(1)} \qquad \text{(VI)}$$

2.4.6.1.2. Berechnung der Trichlormethan-Bildung

Analog kann das bei der Metabolisierung von Tetrachlormethan gebildete Trichlormethan aus der Zunahme seiner Konzentration im Gasraum bestimmt werden. Auch hier stellt sich ein Gleichgewicht der $CHCl_3$-Konzentration zwischen Gasphase und Flüssigkeit ein, das durch den Verteilungskoeffizienten K_{CHCl_3} beschrieben wird:

$$K_{CHCl_3} = \frac{c_{fl}}{c_{gas}} \qquad \text{(VII)},$$

wobei c_{fl} die Konzentration von $CHCl_3$ in der Mikrosomenlösung und c_{gas} die Konzentration von $CHCl_3$ in der Gasphase ist.
Mit dem imaginären Verteilungsvolumen $V_{i(CHCl_3)} = V_{fl} \times K_{CHCl_3} + V_{gas}$ läßt sich die $CHCl_3$-Bildung analog berechnen. Auch hier muß die Abnahme der $CHCl_3$-Konzentration durch den Ventilschaltzyklus berücksichtigt werden, allerdings mit umgekehrtem Vorzeichen: Die zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen gebildete $CHCl_3$-Menge berechnet sich zu

$$\Delta n_{CHCl_3} = V_{i(CHCl_3)} \times (c_{gas(2)} - c_{gas(1)}) + V_e \times c_{gas(1)} \qquad \text{(VIII)}.$$

2.4.6.1.3. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten und des Entnahmevolumens

Für die Berechnung der CCl_4-Metabolisierung bzw. der $CHCl_3$-Bildung ist die Kenntnis der Größe der Verteilungskoeffizienten K_{CCl_4} und K_{CHCl_3} sowie des Entnahmevolumens V_e notwendig.

Die Verteilungskoeffizienten für Trichlor- und Tetrachlormethan wurden bestimmt, indem in das Inkubationssystem (Gesamtvolumen 150 ml) zunächst eine bekannte Menge der Mikrosomenlösung (ohne NADP-Zusatz) gegeben und auf 37°C temperiert wurde. Dann wurde eine definierte Menge Trichlor- bzw. Tetrachlormethan zugesetzt und nach Einstellung des Gleichgewichts die Konzentration der chlorierten Kohlenwasserstoffe im Gasraum gemessen. Durch Umwandlung von Gleichung IV (2.4.6.1.1.) läßt sich daraus V_i bestimmen:

$$V_i = \frac{n}{c_{gas}} \qquad (IX)$$

V_i steht über Gleichung III in folgender Beziehung zu K:

$$K = \frac{V_i - V_{gas}}{V_{fl}} \qquad (X)$$

Damit ergibt sich für K durch Einsetzen in Gleichung IX folgende Berechnungsmöglichkeit:

$$K = \frac{\frac{n}{c_{gas}} - V_{gas}}{V_{fl}} \qquad (XI)$$

Bei Gleichung XI steht im Zähler eine Differenz, die bei gegebenem K um so kleiner werden muß, je kleiner der Wert für V_{fl} gewählt wird. Das bedeutet jedoch, daß sich bei kleinen V_{fl}-Werten Meßfehler stärker auf die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten auswirken können. Daher betrug für diese Versuche die zugesetzte Mikrosomenmenge mindestens 25 ml. Die so für Tetrachlormethan berechneten Verteilungskoeffizienten lagen bei Mikrosomenlösungen mit 2 mg Protein pro ml und 37°C zwischen 0,85 und 1,13; für Trichlormethan zwischen 3,24 und 4,18. Da bei den eigentlichen Metabolisierungsversuchen das Flüssigkeitsvolumen gegenüber dem Gasraum klein war, hatten diese Schwankungen nur einen geringen Einfluß auf das imaginäre Verteilungsvolumen und damit auf die Metabolisierungsberechnung.

Das als Entnahmevolumen V_e bezeichnete Volumen, das beim Probenentnahmezyklus mit Stickstoff gespült wird (siehe Gleichung VI), kann in Abwesenheit der Mikrosomenlösung aus der relativen Abnahme der CCl_4-Konzentration im Inkubationssystem zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen bestimmt werden: Bei einer anfänglichen Konzentration $c_1 = n_1/V_{system}$ wird durch die erste Messung die CCl_4-Menge $n_e = c_1 \times V_e$ aus dem System entfernt und durch Stickstoff ersetzt; für die zweite Messung reduziert sich dadurch die vorhandene CCl_4-Menge auf den Wert $n_2 = c_2 \times V_{system} = n_1 - n_e$.

Durch Einsetzen und Umformen erhält man daraus folgende Beziehung:

$$c_2 \times V_{system} = c_1 \times V_{system} - c_1 \times V_e \quad \text{bzw.} \quad V_e = \frac{c_1 - c_2}{c_1} \times V_{system}$$

Das Entnahmevolumen betrug 5,5 ml, wenn sowohl Ventil 2 und Ventil 3 an das Probenentnahmesystem angeschlossen waren (Messung der chlorierten

Kohlenwasserstoffe und der Alkane). Bei hohen CCl_4-Konzentrationen wurde dabei jedoch durch die Injektionszyklen soviel Tetrachlormethan aus dem System entfernt, daß eine genaue Messung der CCl_4-Metabolisierung schwierig war, wie aus Gleichung VI hervorgeht. Daher wurde zur Metabolisierungsberechnung von Tetrachlormethan in der Regel Ventil 3 für die Probenentnahme zur Alkanbestimmung vom Probenentnahmesystem abgekoppelt, wodurch sich das Entnahmevolumen auf 1,3 ml reduzierte.

2.4.6.1.4. Berechnung der Alkan-Bildung

Die Bildung von Ethan und Pentan wurde auf ähnliche Weise wie beim Trichlormethan bestimmt. Die Berechnung vereinfacht sich jedoch dadurch, daß durch den hohen Dampfdruck der Alkane bei der Berechnung von V_i (siehe 2.4.6.1.1., Gleichung III und IV) der Term $K \times V_{fl}$ gegenüber V_{gas} vernachlässigbar ist ($V_i = V_{gas}$). Gleichung VIII reduziert sich für die Berechnung der Alkanbildung damit zu

$$\Delta n_{alk} = V_{gas} \times (c_2 - c_1) + V_e \times c_1.$$

2.4.6.2. Inkubation mit radioaktivem Tetrachlormethan

Die Inkubation von Mikrosomen mit Tetrachlormethan, das am Kohlenstoffatom radioaktiv markiert war, wurde in entsprechender Weise wie bei den Versuchen mit nichtradioaktivem Tetrachlormethan durchgeführt (siehe 2.4.6.). Das Ziel dieses Versuches bestand jedoch darin, eine möglichst hohe Ausbeute an mikrosomalen Lipiden zu erhalten, die durch kovalente Bindung mit CCl_4-Metaboliten modifiziert sind. Auf eine gaschromatographische Analyse der chlorierten Kohlenwasserstoffe bzw. der Alkane wurde wegen des Problems der Kontamination mit radioaktivem Material verzichtet. Der Versuch wurde aus Sicherheitsgründen im Isotopenlabor unter einem Abzug durchgeführt, dabei wurde die in Abb. 13 dargestellte, vereinfachte Inkubationsapparatur verwendet.

Als Inkubationsgefäß dient ein kleiner Rundkolben (V = 15 ml) mit einem seitlichen Quickfit-Anschluß, der mit einem Teflon-beschichteten Silikonseptum verschlossen ist. Zwei weitere Anschlüsse dienen zur Stickstoffbegasung und können durch Schliffhähne geschlossen werden. Die Stickstoffzufuhr erfolgt aus der Vorratsflasche über ein Nadelventil zur Feinregulierung und eine mit Wasser gefüllte Waschflasche zur Anfeuchtung. Über eine Glas-Schliffverbindung ist an den Gasauslaß eine Kühlfalle angeschlossen, die mit flüssiger Luft gekühlt werden kann. Das Inkubations-

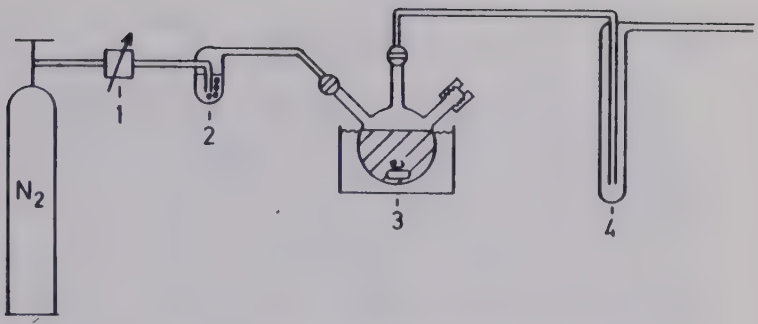


Abb. 13: Inkubationssystem zur anaeroben Metabolisierung von [^{14}C]-Tetrachlormethan
1: Nadelventil; 2: Blasenzähler; 3: Rundkolben mit Inkubationslösung in thermostatisiertem Wasserbad; 4: Kühlfalle

gefäß selbst kann durch ein thermostatisiertes Wasserbad erwärmt werden, ein Magnetrührer sorgt für die Durchmischung des Inkubationsmediums.

Nach reichlicher Spülung der leeren Apparatur mit Stickstoff wurde über den Quickfit-Anschluß die Mikrosomenlösung (Lebermikrosomen von Phenobarbital-induzierten Ratten; siehe 2.4.1.2.) zugegeben und nach Verschluß mit dem Septum das Inkubationssystem unter Eiskühlung weitere 30 Minuten mit Stickstoff gespült. Dann wurden mit einer Spritze 100 µl der NADP-Lösung, die zuvor ebenfalls mit Stickstoff gespült worden war, durch das Septum injiziert. Nach dem Schließen der beiden Hähne wurden mit einer 25-µl-Glasspritze 20 µl der unter 2.1.2. beschriebenen Lösung von radioaktivem Tetrachlormethan in Ethanol zugesetzt und das Inkubationssystem auf 37°C erwärmt. Das Inkubationsmedium mit einem Volumen von 10,37 ml hatte damit folgende Zusammensetzung:

	(Endkonzentration)
10 ml Lebermikrosomen von Phenobarbital-induzierten Ratten in Pufferlösung (3 mg Protein pro ml)	2,92 mg Prot./ml
0,2 ml Na-Isocitratlösung (120 mg/ml in Pufferlösung)	8 mM
50 µl Isocitratdehydrogenase (10 mg/ml in Glycerin)	50 µg/ml
0,1 ml NADP-Lösung (79 mg/ml in Pufferlösung)	1 mM
20 µl $^{14}CCl_4$-Lösung in Ethanol (20 µCi)	11 µMol CCl_4

Pufferlösung: 50 mM Tris-HCl,
120 mM KCl,
5 mM $MgCl_2$;
auf pH 7,5 eingestellt

Nach 60 Minuten Inkubation wurde nicht metabolisiertes Tetrachlormethan und flüchtige Metaboliten durch Begasen mit Stickstoff aus dem Inkubationssystem getrieben und in der Kühlfalle kondensiert. Die Kühlfalle wurde in Abständen von 10 Minuten mit 20 ml Szintillationsflüssigkeit (siehe 2.7.) gespült und die Stickstoffspülung so lange fortgesetzt, bis in der Scintillationslösung keine nennenswerte Radioaktivität mehr nachweisbar war. Anschließend wurden die Lipide entsprechend 2.5.2. aus der Mikrosomensuspension extrahiert.

2.4.7. Inkubation von Mikrosomen unter peroxidierenden Bedingungen

Zur Auslösung der Lipidperoxidation wurden Mikrosomen unter Normalatmosphäre in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems und Zugabe von Fe^{2+}-Ionen, komplexiert mit ADP, inkubiert. Die Inkubationsansätze hatten dabei folgende Zusammensetzung:

	Konzentration im Inkubat
Pufferlösung pH 7,5	
Tris-HCl	50 mM
KCl	120 mM
$MgCl_2$	5 mM
Mikrosomensuspension	2 mg Prot./ml
Natriumisocitrat (2,3 mg/ml)	8 mM
Isocitratdehydrogenase (4,8 µl Enzymlösung/ml)	48 µg/ml
Vorinkubation 5 min bei 37°C	
Start der Reaktion mit 20 µl/ml einer frisch hergestellten Lösung aus	
$FeSO_4$	24 µM
ADP	2 mM
NADP	1 mM

Die Reaktion wurde je nach Art der untersuchten Meßparameter durch Zugabe von Thiobarbitursäure (Malonaldehydbestimmung), Trichlormethan/Methanol (Lipidanalyse) oder Dithionit (Bestimmung von Cytochrom P-450) gestoppt.

2.4.7.1. Inkubation im geschlossenen System

Zur Messung der Alkanfreisetzung aus Mikrosomen unter peroxidierenden Bedingungen wurde die Inkubation in dem unter 2.4.5. beschriebenen geschlossenen Inkubationssystem bei 37°C durchgeführt. Statt mit Stickstoff wurde dabei das Inkubationssystem mit Kohlenwasserstoff-freier synthetischer Luft gespült. Nach Zugabe der Mikrosomensuspension (Zusammensetzung wie unter 2.4.7.) wurde das Inkubationssystem weitere 5 Minuten mit synthetischer Luft gespült, dann wurde das System geschlossen und 5 Minuten äquilibriert. Gestartet wurde die Reaktion wie bei 2.4.7. durch Zugabe der $FeSO_4$-ADP-NADP-Lösung, die in diesem Fall mit einer Spritze durch das Septum in das Inkubationsmedium injiziert wurde. Durch die automatische Entnahme und gaschromatographische Analyse von Gasproben konnte die Bildung von Ethan und Pentan solange verfolgt werden, bis das System zur Entnahme von Flüssigkeitsproben für die Bestimmung von Malonaldehyd und Cytochrom P-450 bzw. zur Extraktion der Lipide geöffnet werden mußte.

2.4.8. Bestimmung von Malonaldehyd bzw. von Thiobarbitursäure-positiven Verbindungen

Wie in der Einleitung (1.4.1.1.) erwähnt wurde, kann Malonaldehyd, das beim peroxidativen Zerfall polyungesättigter Fettsäuren entsteht, aufgrund seiner Farbreaktion mit Thiobarbitursäure photometrisch bestimmt werden. Da auch andere Stoffe mit Thiobarbitursäure eine Farbreaktion ergeben können, müssen solche Verbindungen durch chromatographische Verfahren abgetrennt werden, wenn man mit dieser Methode spezifisch Malonaldehyd erfassen will. Dies wird in den meisten Fällen beim Thiobarbitursäure-Test jedoch nicht durchgeführt, weßhalb auch in der vorliegenden Arbeit auf einen Trennungsschritt verzichtet wurde. Strenggenommen darf hier deßhalb nicht von einer Malonaldehydbestimmung, sondern nur von einer Bestimmung Thiobarbitursäure-positiver Substanzen gesprochen werden.

Der Thiobarbitursäure-Test wurde von Buege und Aust (#20) leicht modifiziert übernommen:

1,0 ml Mikrosomenlösung in Tris-KCl-Puffer,

2,0 ml Thiobarbitursäure-Reagenz (15 g Trichloressigsäure und 375 mg Thiobarbitursäure in 100 ml 0,25 N HCl unter Erwärmen gelöst),

0,1 ml Fe^{2+}-Lösung (1,5 mM $FeSO_4$ in 10-prozentiger Trichloressigsäure) und

0,1 ml BHT-Lösung (20 mg BHT in 10 ml Ethanol gelöst)

werden in einem Reagenzglas zusammengegeben, gut durchmischt und 15 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die Proben zur Sedimentation der ausgefällten Proteine 10 Minuten zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge Rotina S, 2000 upm). Aus dem Überstand wird die Extinktion bei 535 nm gegen einen gleich behandelten Leerwert bestimmt, der statt den Mikrosomen 1,0 ml Pufferlösung enthält (Beckman Spektralphotometer Modell 25). Die Malonaldehyd-Konzentration in der Mikrosomenlösung wird unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von $1{,}56 \times 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$ für den entstandenen Farbstoff (#194) unter Berücksichtigung der Probenverdünnung berechnet.

Der Zusatz von Fe^{2+}-Ionen gegenüber der ursprünglichen Methode von Buege und Aust (#20) wurde vorgenommen, um eine einigermaßen einheitliche Eisenkonzentration im Test zu erhalten (ca. 50 µM Fe^{2+}), da sowohl Mikrosomenlösungen, die von vornherein Eisenionen enthielten (Inkubation von Mikrosomen unter peroxidativen Bedingungen, 2.4.7.), als auch zunächst Eisen-freie Mikrosomenlösungen (Inkubation von Mikrosomen mit CCl_4) der Malonaldehydbestimmung unterzogen wurden; dadurch wurden Schwankungen der Malonaldehydbildung aufgrund unterschiedlicher Eisen-Konzentrationen weitgehend vermieden (#5;#193). Das Antioxidans BHT wurde zugesetzt, um eine Oxidation der unzersetzten polyungesättigten Fettsäuren durch die Eisenionen während des Thiobarbitursäure-Tests zu verhindern (#5).

2.5. Analyse mikrosomaler Lipide

2.5.1. Lipidextraktion aus Mikrosomen

Die Extraktion von Lipiden aus Mikrosomensuspensionen erfolgte entsprechend der von Nelson abgewandelten Methode nach Folch (#46;#107):

Ein Volumenteil der Mikrosomensuspension wird unter Rühren in 16 Volumenteile eiskalten Methanols getropft, das als Antioxidans 5 mg BHT pro 100 ml enthält. Nach fünfminütigem Rühren werden zweimal 16 Volumenteile eiskalten Trichlormethans (enthält ebenfalls 5 mg BHT/100 ml) unter weiterem Rühren zugegeben, zwischen den einzelnen Zugaben und am Schluß wird 5 Minuten in der Kälte weitergerührt. Anschließend wird zur Abtrennung des ausgefallenen Proteins durch eine Glasfritte filtriert und dreimal mit zwei Volumenteilen einer Trichlormethan-Methanol-Mischung (2:1; v/v) nachgespült. Entsprechend der ursprünglichen Proteinmenge in den Mikrosomen wird nun pro mg Protein etwa 0,4 g Sephadex G-25 coarse zum Filtrat zugesetzt, um überschüssiges Wasser und gelöste polare Substanzen zu binden. Das Filtrat wird dann am Rotationsverdampfer bei 25°C eingeengt und zur vollständigen Entfernung von Wasser solange Trichlormethan zugesetzt, bis das im Rotationsverdampfer zurückbleibende Sephadex trocken erscheint. Der Rückstand wird in Trichlormethan aufgenommen und zur Abtrennung des Sephadex über eine Glasfritte filtriert und das Sephadex-Material und die Fritte gründlich mit Trichlormethan nachgewaschen. Die vereinigten Trichlormethan-Extrakte werden dann auf wenige Milliliter eingeengt und bis zur weiteren Verwendung in einem gut verschlossenen Gefäß (Reacty-vial, Kulturröhrchen oder Bördelkappenampulle mit Teflondichtung) bei -20°C gelagert.

Alle bei der Extraktion verwendeten Gefäße werden vorher mit Methanol-Trichlormethan-Lösung fettfrei gespült. Zur Vermeidung des Einschleppens von Weichmachern werden außer Teflon-haltigen Materialien nach Möglichkeit keine Plastikgefäße bzw. Plastikmaterialien benützt.

2.5.2. Analyse der Phospholipide

Eine Trennung des mikrosomalen Lipidextrakts in einzelne Lipidklassen kann dünnschichtchromatographisch oder säulenchromatographisch mit Kieselgel als Adsorbens erreicht werden.

2.5.2.1. Dünnschichtchromatographische Phospholipidtrennung

Zur Trennung der Phospho- und Lysophospholipide haben sich Bedingungen, wie sie von Touchstone et al. (#171) entwickelt wurden, am besten bewährt. Als Plattenmaterial wurden Kieselgel-beschichtete Fertigplatten benützt, die mit Methanol - Trichlormethan - Essigsäure (2:1:1; v/v) vorgereinigt und vor der Trennung zwei Stunden bei 120°C aktiviert worden waren. Die extrahierte Lipidlösung wurde je nach Menge punkt- oder strichförmig mit einer 25-µl-Hamilton-Spritze mit stumpfer Kanüle auf die Platten aufgetragen. Nach Verdunsten des Lösungsmittels wurden die Dünnschichtplatten in einer DC-Kammer, die mit Filterpapier ausgekleidet und mit dem Fließmittel äquilibriert war, etwa zwei Stunden (bei HPTLC-Platten eine Stunde) entwickelt.

Fließmittel:
Trichlormethan - Ethanol - Wasser - Triethylamin (30:40:8:20; v/v)

2.5.2.1.1. Detektion durch Veraschung

Als sehr empfindliche Detektionsmethode aller Lipidverbindungen wurde die Veraschungsmethode nach Fewster et al. (#44) angewandt:

Zur vollständigen Entfernung des Fließmittels wird die DC-Platte zunächst 10 Minuten auf 180°C im Trockenschrank erhitzt und nach dem Abkühlen mit einer Lösung von 3 Prozent Kupfer(II)-Acetat in 8-prozentiger Phosphorsäure besprüht, bis die Platte gleichmäßig durchfeuchtet ist. Nach kurzem Trocknen an der Luft wird die Platte wiederum 10 Minuten bei 180°C erhitzt, dabei treten die lipidhaltigen Zonen als grau-schwarze Banden gegen den ungefärbten Hintergrund hervor.

Mit dieser Methode können Substanzmengen von 0,3 µg noch gut nachgewiesen werden. Die Färbung bleibt über mehrere Tage stabil, zur Dokumentation können von den Platten Densitogramme mit einem Zeiss-DC-Scanner bei 580 nm aufgenommen werden. Eine quantitative Auswertung dieser Densitogramme ist nicht ohne weiteres möglich, da je nach Zusammensetzung der Lipidkomponenten der Schwärzungsgrad der Zonen variiert. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, daß durch die Detektion die Lipide zerstört werden und daher für weitere Untersuchungen nicht mehr verwendet werden können.

2.5.2.1.2. Detektion mit Rhodamin B

Als nicht-destruktive Nachweismethode für die getrennten Lipidverbindungen wurde die Fluoreszenzlöschung nach Besprühen der Platte mit Rhodamin-B-Lösung (Merck-Sprühreagenz) angewandt. Allerdings ist diese Methode weniger empfindlich; da sie jedoch bei Trennungen für präparative Zwecke angewandt wurde, reichte die Empfindlichkeit aus.

2.5.2.1.3. Detektion von radioaktiv markierten Lipiden

Lipide, die durch kovalente Bindung mit $^{14}CCl_4$-Metaboliten radioaktiv markiert waren, konnten auf der Platte mit einem Berthold-DC-Scanner (Modell LB 2723), der mit einer Methan - Argon - Durchflußzählkammer ausgestattet war, registriert werden.

Die Zuordnung der getrennten Lipidfraktionen zu den einzelnen Lipidklassen erfolgte durch Vergleich der R_f-Werte entsprechender Referenzsubstanzen.

2.5.2.1.4. Elution von Phospholipiden aus den DC-Platten

Phospholipidfraktionen, die für weitere Untersuchungen benötigt wurden, wurden mit einem Flecken-Eluator (Firma Desaga, Heidelberg) von der Plattenoberfläche abgekratzt und vom Kieselgelmaterial durch mehrmaliges Waschen mit einer Lösung von Trichlormethan - Methanol - Wasser (5:5:1; v/v) eluiert. Für die Herstellung von Fettsäuremethylestern (2.5.3.1.1.) war eine Abtrennung des Kieselgelmaterials nicht erforderlich.

2.5.2.2. Säulenchromatographische Phospholipid-Trennung

Als stationäre Phase zur säulenchromatographischen Trennung wurde ebenfalls Kieselgel verwendet (#145). Eine Glassäule (23 cm x 1 cm) mit Glasfrittenboden, Hahnauslaß mit Teflonkücken und einem Flüssigkeitsreservoir (50 ml) wurde mit Kieselgel gefüllt, das 3 Stunden bei 120°C aktiviert worden war; das Bettvolumen betrug ca. 15 ml. Die Säule wurde mit dem 10-fachen Volumen Trichlormethan äquilibriert, dann wurde der Lipidextrakt, gelöst in einigen ml Trichlormethan, mit einer Pasteurpipette auf die Säule aufgetragen; die Flüssigkeit ließ man dabei langsam in das Kieselgelmaterial einsickern. Anschließend wurde zuerst mit 50 ml reinem Trichlormethan eluiert, dann mit einem Gradienten, der steigende Mengen an Methanol enthielt (Gesamtmenge 100 ml Trichlormethan, 250 ml Methanol). Der Gradient kam dadurch zustande, daß das Methanol über eine

Schlauchverbindung in das luftdicht abgeschlossene Trichlormethan-Vorratsgefäß nachfloß und dort mit einem Magnetrührer gemischt wurde. Dieses Vorratsgefäß war mit der Chromatographiesäule über einen weiteren Teflonschlauch ebenfalls luftdicht verbunden, so daß durch Heben oder Senken des Vorratsgefäßes der Flüssigkeitsspiegel in der Säule so eingestellt werden konnte, daß das Kieselgelmaterial immer von einer ca. 1 cm hohen Schicht des Elutionsmittels bedeckt war. Die Elution erfolgte durch den hydrostatischen Druck des Elutionsmittels, das Eluat wurde in Fraktionen von je 400 Tropfen aufgefangen. Von den einzelnen Fraktionen wurden Aliquote zur dünnschichtchromatographischen Analyse der Phospholipide (2.5.2.1.) bzw. zur Radioaktivitätsbestimmung (2.7.) entnommen.

Die säulenchromatographische Trennung hat den Nachteil, daß sie ziemlich zeitaufwendig ist; bis zur Elution aller Phospholipidklassen vergehen etwa 8 Stunden. Das hat zur Folge, daß eine Aufarbeitung aller Fraktionen am gleichen Tag normalerweise nicht möglich ist. Da das Elutionsmittel jedoch Methanol enthält, werden in dieser Zeit die Phospholipide teilweise umgeestert. Aus diesem Grund wurde auch für präparative Lipidtrennungen die dünnschichtchromatographische Methode vorgezogen.

2.5.2.3. Phosphatbestimmung in den Phospholipiden

Der Phosphatgehalt der Phospholipide wurde nach saurer Hydrolyse photometrisch nach der von Penney entwickelten Methode bestimmt (#118;#150). Gegenüber der traditionellen Bestimmungsmethode, die auf der Reduktion eines Phosphomolybdat-Komplexes zu Molybdän-Blau beruht (#9), benötigt diese Methode einen geringeren Zeitaufwand und ist außerdem empfindlicher. Das Prinzip des Phosphatnachweises besteht hier auf der Bildung einer Komplexverbindung von Phosphomolybdat mit einem Triphenylmethan-Farbstoff, die photometrisch quantitativ bestimmt wird. Als empfindlicher Farbstoff hat sich dabei Malachitgrün (siehe Abb. 14) erwiesen.

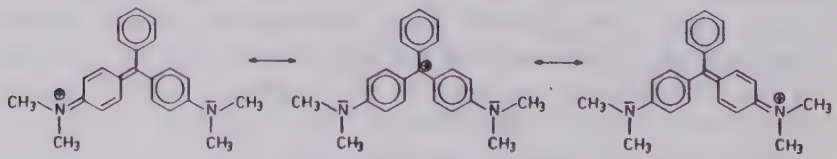


Abb. 14: Resonanzstruktur von Malachitgrün

Im stark sauren Bereich (pH um 0) ist der Farbstoff normalerweise gelb, da die Resonanz durch Protonierung der tertiären Aminogruppe eingeschränkt ist. In Gegenwart von Phosphomolybdat bildet sich jedoch im sauren Bereich eine grüne Komplexverbindung mit einem Extinktionsmaximum bei 645 nm. Für die Phosphatbestimmung ist die Einhaltung eines stark sauren Milieus (pH = 0) wichtig, da bei höheren pH-Werten eine grüne Komplexverbindung auch mit Molybdat alleine auftreten kann (#118).

Zur Hydrolyse der Phospholipide wurden die Proben (Lipidextrakte bzw. Eluate aus der DC-Trennung) in Kulturröhrchen gegeben, die durch zweimaliges Kochen in Aqua bidest phosphatfrei gespült worden waren. Nachdem das Lösungsmittel durch Evakuieren in einer Zentrifuge (Speed-vac-Zentrifuge) entfernt worden war, wurde zu jeder Probe 0,5 ml einer 70-prozentigen Perchlorsäure zupipettiert und die Kulturröhrchen danach in einem Heizblock eine Stunde bei 170°C erhitzt (#150).

Testansatz zur Phosphatbestimmung:

1,0 ml Molybdat-Lösung (1 g Ammoniumheptamolybdat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$, gelöst in 100 ml Aqua bidest)

0,1 ml Probe (in 70-prozentiger Perchlorsäure, nach Hydrolyse bei 170°C) bzw. als Leerwert 70-prozentige Perchlorsäure

wurden in einer Halbmikroküvette gut durchmischt und die Extinktion dieser Lösung bei 645 nm auf Null kompensiert.

Nach einer Wartezeit von einer Minute wurden

0,05 ml Malachitgrünlösung (600 mg Malachitgrün pro l Wasser mit einem Zusatz von 0,1 Prozent Nonidet)

zugesetzt und mit der Pipette gut durchmischt. Die Extinktion wurde nach etwa einer Minute beim Maximum der Farbentwicklung bei 645 nm abgelesen.

Bei jeder Messung wurde mit einer Phosphat-Standardlösung (0 - 100 µl einer 3 mM Kaliumdihydrogenphosphatlösung) eine Eichkurve erstellt. Die Extinktion des Leerwerts konnte bei den einzelnen Eichkurven stark variieren (0,04 - 0,12 OD), innerhalb einer Meßreihe betrug die Standardabweichung des Leerwerts maximal 0,005 OD. Die Steigung der Eichkurve blieb dagegen immer konstant, pro nMol Phosphat im Testansatz ergab sich eine Extinktionszunahme von 0,085 OD $\pm$ 2 Prozent. Die Eichkurve war bis zu einer Extinktion von 0,7 OD linear, stärker konzentrierte Proben wurden mit 70-prozentiger Perchlorsäure entsprechend verdünnt.

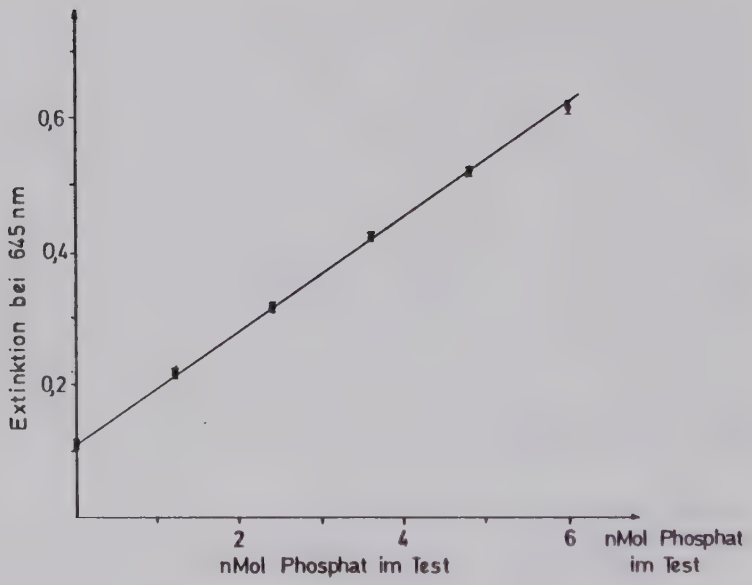


Abb. 15: Eichkurve zur Phosphatbestimmung

2.5.3. Fettsäure-Analyse

2.5.3.1. Synthese von Fettsäuremethylestern

Das aus den Mikrosomen extrahierte Lipidmaterial enthält Fettsäuren, die zu einem kleinen Teil frei vorliegen, zum größeren Teil aber verestert in den Phospholipiden und Cholesterinestern vorkommen. Zur gaschromatographischen Analyse müssen die Fettsäuren in leicht flüchtige Verbindungen überführt werden, was durch Veresterung bzw. Umesterung zu Fettsäuremethylestern erreicht wird.

2.5.3.1.1. Veresterung mit 14-prozentiger Bortrifluorid-Lösung in Methanol

Als Standardmethode zur Herstellung der Fettsäuremethylester wurde die Veresterung mit 14-prozentiger BF_3-Lösung in Methanol angewandt (#70):

Das extrahierte Lipidmaterial wird in ein Kulturröhrchen gegeben und das Lösungsmittel unter Stickstoff abgeblasen. Kieselgel-haltiges Lipidmaterial (nach DC-Trennung) kann direkt in die Kulturröhrchen gegeben

werden, da die Anwesenheit des Kieselgels keinen Einfluß auf die Veresterung hat. Pro 10 mg Lipidmaterial wird 1 ml einer 14-prozentigen Lösung von Bortrifluorid in Methanol zugesetzt, bei kleineren Mengen mindestens aber 0,5 ml. Nach dem Zuschrauben mit einer Teflon-beschichteten Verschlußkappe werden die Kulturröhrchen in einem Heizblock eine Stunde auf 100°C erhitzt, bei Abwesenheit von Sphingomyelin in den Proben reichen auch 30 Minuten. Nach dem Abkühlen setzt man die gleiche Volumenmenge an Wasser zu und extrahiert die Fettsäuremethylester dreimal mit zwei Volumenteilen n-Hexan.

2.5.3.1.2. Veresterung mit Diazomethan

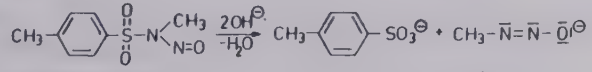
Zur selektiven Veresterung von freien Fettsäuren, die bei der Phospholipase-Behandlung entstanden (2.6.), wurde Diazomethan verwendet:

$$RCOOH + CH_2N_2 \longrightarrow RCOO^- + CH_3^+ + N_2 \longrightarrow RCOOCH_3 + N_2$$

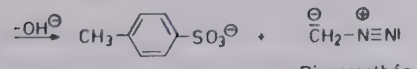
Veresterte Fettsäuren können dabei nicht reagieren, da sie kein Proton für die Bildung des Carbeniumions bereitstellen können.

Die Lipidprobe wird in einem Kulturröhrchen unter Stickstoff eingedampft, dann werden 0,3 ml wasserfreier Diethylether, dem ein Tropfen Methanol zugesetzt ist, hinzugefügt. In diese Lösung wird etwa 15 Minuten lang Diazomethan eingeleitet, bis die Etherlösung deutlich gelb gefärbt ist. Das Kulturröhrchen wird verschlossen und 30 Minuten stehen gelassen, um eine vollständige Veresterung zu garantieren. Anschließend bläst man das Lösungsmittel mit Stickstoff ab und nimmt den Rückstand in 0,5 ml Methanol-Wasser (1:1; v/v) auf. Die Extraktion der Fettsäuremethylester aus dieser Lösung erfolgt wie unter 2.5.3.1.1. beschrieben mit n-Hexan.

Diazomethan wurde durch tropfenweise Zugabe einer 1N methanolischen Kaliumhydroxidlösung zu N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid in der von M. Wiegand beschriebenen Apparatur erzeugt (#189). Wegen der hohen Toxizität von Diazomethan wurde die Reaktion in einem gut gelüfteten Abzug durchgeführt.



N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid — Diazotat



Diazomethán

2.5.3.1.3. Katalytische Hydrierung von Fettsäuremethylestern

In einigen Fällen wurden Fettsäuremethylester-Proben für die GC-MS-Analyse zur Absättigung der C-C-Doppelbindungen in den Fettsäuren folgendermaßen katalytisch hydriert:

Zu den Proben, die in Ethanol gelöst sind, wird als Katalysator eine Spatelspitze Platin(IV)oxid zugegeben und dann über eine Kanüle mehrere Stunden lang Wasserstoff in die Probe geleitet. Nachdem sich der Katalysator abgesetzt hat, wird die Lösung abgehoben, das Ethanol durch Vakuumzentrifugation entfernt und der Rückstand in n-Hexan gelöst.

2.5.3.2. Chromatographische Verfahren

2.5.3.2.1. Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester

Fettsäuremethylester können von anderen Lipidkomponenten durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten abgetrennt werden.

Die Kieselgelplatten werden wie unter 2.5.2.1. beschrieben vorgereinigt und aktiviert, bevor die Lipidproben aufgetragen werden. Als Fließmittel wird n-Hexan - Diethylether - Essigsäure (80:20:1,5; v/v) verwendet; die Trennung erfolgt in einer mit dem Fließmittel äquilibrierten Chromatographie-Kammer. Entwickelt wird bis zu einer Laufstrecke von 15 - 18 cm. Zur Detektion können die gleichen Methoden wie bei der Phospholipid-DC benützt werden (siehe 2.5.2.1.1.). Für die weitere Analyse der getrennten Fettsäuremethylester werden die entsprechenden Zonen mit einem Fleckeneluator (Firma Desaga) ausgekratzt und die Fettsäuremethylester mit Methanol eluiert.

2.5.3.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Fettsäuremethylestern

Eine Auftrennung der Fettsäuremethylester kann durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit LiChrosorb RP-18 als stationärer Phase erreicht werden. Dieses Material besteht aus irregulär geformten Kieselgelteilchen, deren Oberflächen durch chemische Bindung mit Octadecylgruppen vollständig abgesättigt sind. Das Material eignet sich besonders zur Trennung von lipophilen Substanzgemischen; die Trennwirkung beruht in erster Linie auf der unterschiedlichen Löslichkeit der einzelnen Substanzkomponenten zwischen mobiler und stationärer Phase (Verteilungschromatographie).

Für die Trennungen stand ein vollautomatisches HPLC-System zur Ver-

fügung. Endsprechend Abb. 16 setzt sich dieses System aus 2 HPLC-Pumpen (Modell LC 250/1; Kratos Inc.), die durch einen Mikroprozessor (Klic 1; Kratos Inc.) gesteuert werden können, einem automatischen Probengeber (Typ WISP 710 B; Waters), einer Vorsäule (30 x 4 mm, gepackt mit Perisorb RP-18, Korngröße 30 - 40 µm), der eigentlichen Trennsäule (Hibar-Fertigsäule 250 x 4 mm, gepackt mit LiChrosorb RP-18, Korngröße 10 µm), einem UV-Durchflußdetektor (Spectroflow 773, Kratos Inc.), gekoppelt mit einem Integrator (Integrator 3380 S; Hewlett-Packard) und einem programmierbaren Fraktionssammler (FRAC-100, Pharmacia Fine Chemicals) zusammen.

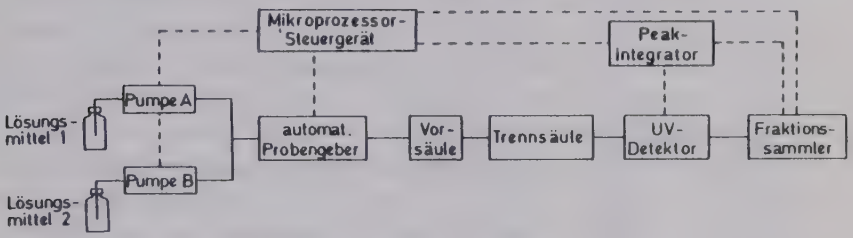


Abb. 16: Blockdiagramm des vollautomatischen HPLC-Systems

Der Mikroprozessor steht mit dem automatischen Probengeber in Kontakt, außerdem kann über ihn der Fraktionssammler und der Integrator gestartet bzw. gestoppt werden. Vom Fraktionssammler kann an den Integrator bei jedem Fraktionswechsel ein Signal übermittelt werden.

Die zur Elution verwendeten Lösungsmittel wurden vor den Versuchen frisch destilliert, über eine Glasfritte (Porengröße 4) zur Entfernung von Staub- oder Schmutzpartikeln filtriert und durch Ultraschallbehandlung (5 min) entgast.

Zur Trennung der Fettsäuremethylester wurde als mobile Phase ein Methanol-Wasser-Gemisch (92:8; v/v) verwendet, die Flußrate betrug 1 ml/min. Vor der Injektion der Probe wurde das HPLC-System mit etwa 60 ml der mobilen Phase äquilibriert und dann die Proben nach entsprechender Konzentrierung mit dem Probengeber injiziert (10 - 50 µl). Die Trennung wurde durch Registrieren der Absorption des Säuleneluats bei 206 nm verfolgt; das Eluat wurde normalerweise in Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt. Bei einer Flußrate von 1 ml/min ist die Trennung der Fettsäuremethylester nach 45 Minuten beendet, das in dieser Zeitspanne nicht eluierte Material konnte durch anschließende Elution mit einem Gemisch aus

n-Hexan und Isopropanol (2:1; v/v) aus dem Säulenmaterial herausgelöst werden.

Abb. 17 zeigt das Chromatogramm eines Fettsäuremethylester-Standardgemisches unter den oben angeführten Bedingungen. Ungesättigte Fettsäuremethylester geben dabei entsprechend ihrer Anzahl von Doppelbindungen ein wesentlich intensiveres Signal bei 206 nm als gesättigte Fettsäuremethylester, die als Chromophor nur die Carboxylfunktion enthalten.

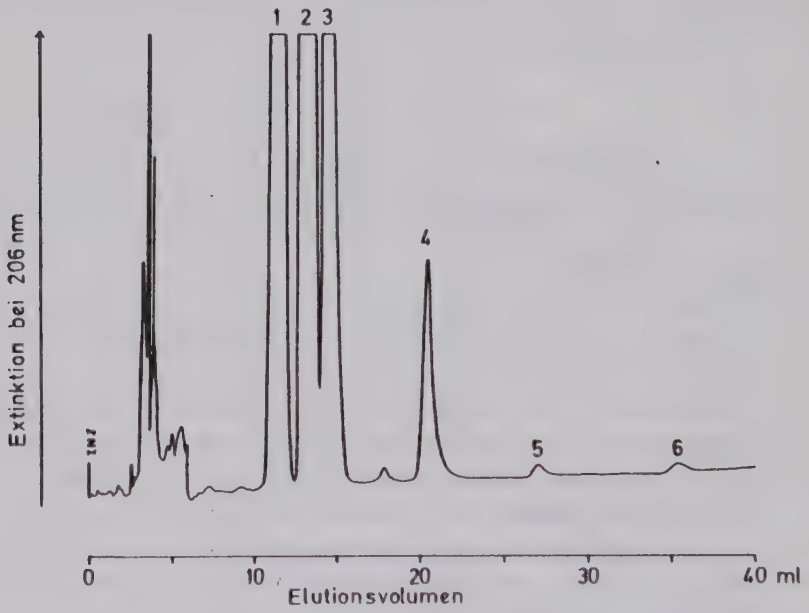


Abb. 17: HPLC-Trennung eines Fettsäuremethylester-Standardgemischs (Analysenbedingungen siehe Text; Schreibervollausschlag 0,03 OD) Die Probe enthielt je 2 µg folgender Methylester (ME) in n-Hexan:
1: Linolensäure-ME (18:3-ME);
2: Arachidonsäure-ME (20:4-ME);
3: Linolsäure-ME (18:2-ME);
4: Ölsäure-ME (18:1-ME) und Palmitinsäure-ME (16:0-ME);
5: Heptadecansäure-ME (17:0-ME);
6: Stearinsäure-ME (18:0-ME).

2.5.3.2.3. Gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester mit dem Flammenionisationsdetektor (FID)

Die quantitative Analyse der Fettsäuremethylester erfolgte durch Gas-Flüssigkeits-Kapillarchromatographie in einem Gaschromatographen der Firma Carlo Erba (Typ Fractovap Series 2150). Als Trennsäulen wurden Kapillarsäulen verwendet, die in unserem Labor selbst hergestellt wurden und mit OV 101 bzw. SP 2100 oder FFAP als stationärer Phase belegt waren (Säulendimensionen: Innendurchmesser 0,25 mm, Länge 25 oder 50 m).

OV 101 und SP 2100 sind Methylsilikone, die aufgrund ihrer geringen Polarität in erster Linie zu einer Trennung nach dem Siedepunkt der einzelnen Probenkomponenten führen. FFAP (Free Fatty Acid Phase) ist ein Reaktionsprodukt von Polyethylenglycol mit 2-Nitroterephthalsäure, das wegen seiner höheren Polarität ungesättigte Fettsäuremethylester stärker retardiert als gesättigte gleicher Kettenlänge, die Retentionszeit wird daher sowohl vom Siedepunkt als auch vom Sättigungsgrad der Fettsäuremethylester beeinflußt. Als Trägergas wurde Wasserstoff bei einem Druck verwendet, der dem Van-Deemter-Optimum der benützten Säule entsprach (40 - 100 kPa). Der Flammenionisationsdetektor wurde mit Wasserstoff (40 kPa) und synthetischer Luft (70 kPa) betrieben.

Die manuelle Injektion der Probe mit einer 5µl-Spritze (Hamilton Nr. 85) - maximal 1 µl des Hexanextrakts - erfolgte entweder splitlos bei einer Säulentemperatur von 60°C oder bei stärker konzentrierten Proben mit Splitting bei 140-180°C. Nach der Injektion wurde die Säulentemperatur mit einem Temperaturprogramm langsam auf maximal 205°C (FFAP-Säulen) bzw. 280°C (OV 101- und SP 2100-Säulen) erhöht (2-5°C/min). Die Injektor- und Detektortemperatur lag dabei immer um etwa 20°C über der maximalen Säulentemperatur.

Für Serienanalysen wurde ein automatischer Probengeber benützt, der bis zu 23 Proben aufnehmen konnte. Dazu wurden die Proben in einseitig zugeschmolzene Mikrokapillaren (Länge 2 mm) pipettiert und nach dem Verdunsten des Lösungsmittels in den Probengeber gesetzt, welcher auf den Injektorblock des Gaschromatographen aufgeschraubt war. Dann wurde der Probengeber auf -5°C abgekühlt und mit Trägergas gespült. Zur Analyse der einzelnen Proben wurden die Mikrokapillaren über eine Druckluft-gesteuerte Mechanik in den Injektor befördert; die Säulentemperatur wurde während dieser Zeit auf 60°C gehalten und anschließend das Temperaturprogramm gestartet. Der Trägergasstrom wurde bei dieser Betriebsart nicht gesplittet.

Die elektrischen Signale des FID wurden von einem Integrator (SP 4100; Spectra-Physics) aufgezeichnet und verarbeitet (Peakintegration). Für die quantitative Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung wurden die Peakflächen der einzelnen Fettsäuremethylester auf einen internen Standard bezogen, der dem zu analysierenden Lipidmaterial in bekannter Konzentration zugesetzt worden war. Als interner Standard diente Heptadecansäure, die als ungeradzahlige Fettsäure in Säugetieren nur in Spuren zu finden ist. Durch Zugabe dieses Standards noch vor der Lipidextraktion bzw. vor der Synthese der Fettsäuremethylester ist die Quantifizierung weitgehend unabhängig von den Ausbeuten der einzelnen Aufarbeitungs- und Derivatisierungsschritte und wird auch nicht von der in den Gaschromatographen injizierten Menge beeinflußt. Der Responsfaktor zwischen Peakfläche und Konzentration der einzelnen Fettsäuremethylester wurde regelmäßig mit einem Fettsäuremethylester-Standardgemisch mit bekannter Zusammensetzung bestimmt.

In Abb. 18 sind die Chromatogramme eines solchen Standardgemisches gezeigt. Bei dreimaliger Analyse der gleichen Probe ergab sich für die einzelnen Fettsäure-Bestimmungen eine Standardabweichung zwischen zwei und sechs Prozent des gefundenen Mittelwerts.

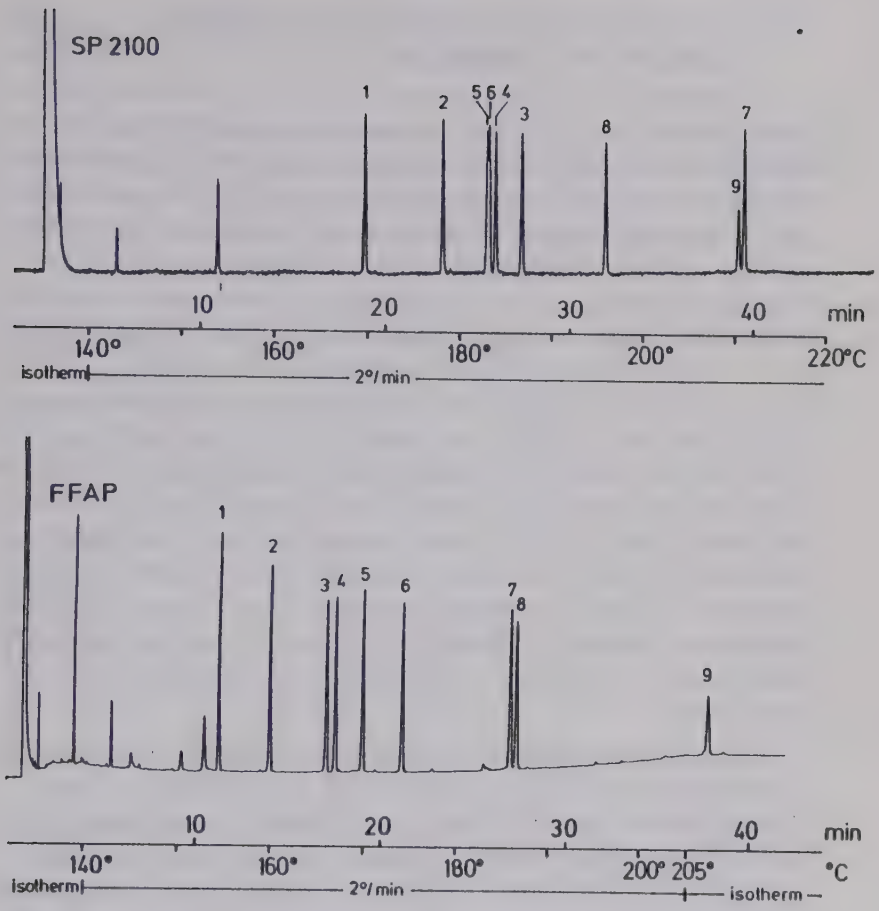


Abb. 18: Gaschromatographische Analyse eines Fettsäuremethylester-Standardgemisches (160 ng/µl je Methylesterverbindung in n-Hexan), Probenmenge 0,5 µl, Split 1 : 20
oben: auf 30m-Kapillarsäule, belegt mit SP 2100
unten: auf 20m-Kapillarsäule, belegt mit FFAP
1: Palmitinsäure-ME; 2: Heptadecansäure-ME; 3: Stearinsäure-ME; 4: Ölsäure-ME; 5: Linolsäure-ME; 6: Linolensäure-ME; 7: Heneicosansäure-ME; 8: Arachidonsäure-ME; 9: Docosahexaensäure-ME.

2.5.3.2.4. Gaschromatographische Analysen unter Verwendung des Elektroneneinfangdetektors

Ein sehr empfindlicher und außerdem stark selektiver Detektor für halogenierte Verbindungen stellt der Elektroneneinfangdetektor (ECD) dar. Das Detektionsprinzip läßt sich wie folgt beschreiben: Durch einen ß-Strahler werden Trägergasmoleküle ionisiert. Die dabei gebildeten primären Elektronen besitzen praktisch nur thermische Energie und werden als Nullstrom durch die Beschleunigungsspannung zur Anode abgeführt. Werden von der Trennsäule Substanzen eluiert, so können sie je nach ihrer Elektronegativität die Primärelektronen unter Bildung negativer Molekülionen einfangen:

$$M + e^- \longrightarrow M^- + \text{Energie}$$

Je nach Molekülart ist dabei auch eine Dissoziation der Molekülionen möglich. Die angelegte Spannung reicht jedoch nicht zu einer merklichen Beschleunigung der wesentlich schwereren Molekülionen zur Anode hin aus, sie rekombinieren entweder mit positiven Trägergasmolekülen oder werden mit dem Trägergas aus dem Detektor gespült. Damit wird durch den Elektroneneinfang der Nullstrom an der Anode erniedrigt und die eluierte Substanz detektiert. Da organische Halogenide eine sehr starke Tendenz zur Elektronenanlagerung aufweisen, sollte der ECD zum Nachweis von Additionsverbindungen zwischen Fettsäuremethylestern und CCl_4-Metaboliten besonders gut geeignet sein.

Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde ein ECD der Firma Carlo Erba (Typ ECD-HT25) mit ^{63}Ni als Strahlungsquelle in Verbindung mit einem ECD-Kontrollmodul (Modell 251; Carlo Erba) benützt. Da zur Trennung eine Kapillarsäule mit Wasserstoff als Trägergas verwendet wurde, mußte für den Detektorbetrieb ein Make-up-Gas (Argon - Methan, 90:10, v/v) zugeführt werden, um die nötige Konzentration an thermischen Elektronen aufrechterhalten zu können. Der Detektor wurde bei 300°C im sogenannten "constant current mode" betrieben; in dieser Betriebsart wird die Anodenspannung (40 mV) als kurzer Puls (0,5 µsec) an den Detektor angelegt, die Zeitdauer zwischen den einzelnen Pulsen wird durch einen Regelkreis dabei so gesteuert, daß auch bei der Elution einer Elektronen-einfangenden Substanz der Nullstrom konstant bleibt. Damit wird der Anstieg der Pulsfrequenz zum Maß für die Konzentration der eluierten Verbindung. Der Vorteil dieser Betriebsart besteht darin, daß das Detektorsignal über einen Bereich von vier Zehnerpotenzen linear zur Substanzkonzentration ist. Der Nullstrom

betrug an unserem Gerät bei einer Detektordurchflußgeschwindigkeit von 34 ml/min 2,7 nA (Make-up-Gas 30 ml/min, Wasserstoff als Trägergas 3,5 ml/min).

Als Trennsäule wurde eine 50-m-Kapillarsäule mit OV 101 als stationärer Phase benutzt (Trennleistung 2100 theoretische Böden pro Meter). Trägergas war Wasserstoff mit einem Säulenvordruck von 100 kPa (Durchflußgeschwindigkeit 3,5 ml/min). Die Proben wurden splitlos bei 60°C injiziert, die

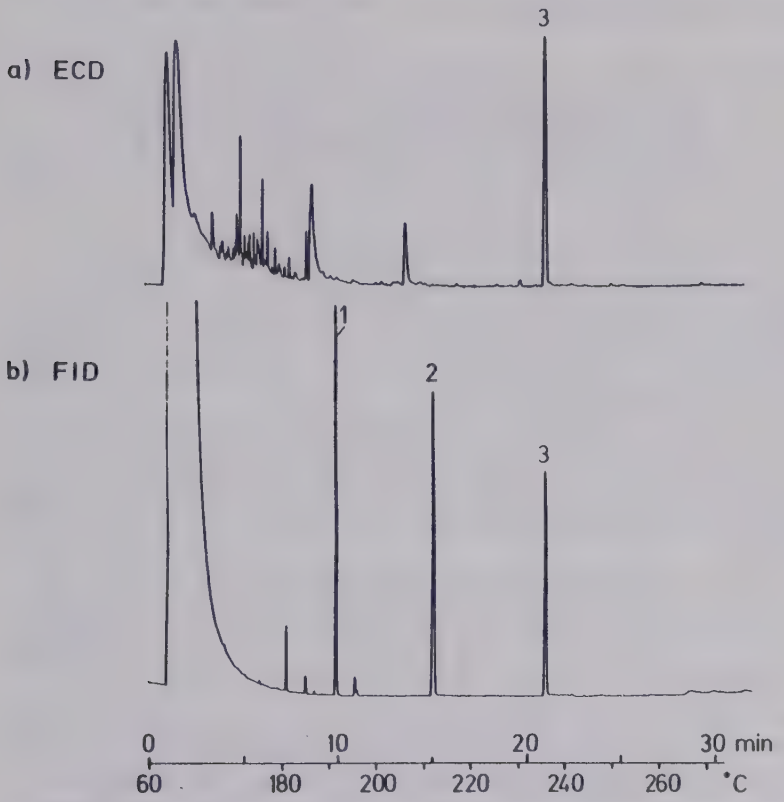


Abb. 19: Gaschromatographische Analyse eines Gemisches von Heptadecansäure-ME (1), Eicosansäure-ME (2) und Dibromstearinsäure-ME (3) mit einer 50m-Kapillarsäule (OV 101) unter gleichen Bedingungen
a) bei Detektion mit einem Elektroneneinfangdetektor (ECD)
b) bei Detektion mit einem Flammenionisationsdetektor (FID)
Analysenbedingungen siehe Text

Injektionstemperatur betrug 300°C. Die Trennung wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

60°C, 2 min $\xrightarrow{40°C/min}$ 180°C, 2 min $\xrightarrow{4°C/min}$ 280°C, 3 min.

Als Beispiel für die Selektivität des ECD gegenüber dem FID sind die Chromatogramme eines Substanzgemisches aus Heptadecansäuremethylester (148 µg/ml), Eicosansäuremethylester (130 µg/ml) und Dibromstearinsäuremethylester (174 µg/ml) unter gleichen Trennbedingungen mit den beiden Detektoren gezeigt (Abb. 19).

2.5.3.3. Analyse der Additionsverbindungen zwischen Fettsäuremethylestern und Tetrachlormethan-Metaboliten durch Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS)

GC/MS-Untersuchungen wurden an einem Finnigan-MAT-Gerät, Typ 4021, ausgerüstet mit einem Incos-Datensystem, durchgeführt.

Die gaschromatographische Trennung erfolgte hierbei mit einer 30-m-Kapillarsäule (I.D. 0,25 mm), belegt mit OV 101 als stationärer Phase, und Helium als Trägergas mit einem Säulenvordruck von 108 kPa. Nach der Injektion von etwa 1 µl der Probe (gelöst in n-Hexan) wurde folgendes Temperaturprogramm gestartet:

60°C, 0,5 min $\xrightarrow{40°C/min}$ 170°C $\xrightarrow{3°C/min}$ 200°C $\xrightarrow{15°C/min}$ 300°C.

Die Temperatur des Injektorblocks betrug 280°C; das Kopplungsstück zwischen dem Gaschromatographen und dem Massenspektrometer war auf 290°C geheizt.

Die aus dem Gaschromatographen eluierten Substanzen werden in der Ionenquelle des Massenspektrometers bei 290°C ionisiert; je nach Betriebsart werden die Ionen dabei durch direkten Elektronenbeschuß (Elektronenstoß-Ionisation, EI) erzeugt oder durch chemische Reaktion mit einem Reaktantgas, das durch Elektronenbeschuß ionisiert ist (chemische Ionisation, CI). Als Reaktantgas wurde dabei Isobutan, Ammoniak oder Methan verwendet. Die im Massenspektrometer aufgetrennten Ionen wurden nach Verstärkung durch einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) registriert, am SEV lag je nach Betriebsart eine Spannung zwischen 1500 und 1800 Volt.

Bei dem Massenspekrometer handelt es sich um ein Quadrupol-Gerät, das den eingestellten Massenbereich innerhalb einer Sekunde durchlaufen kann. Die während der gaschromatographischen Trennung ständig aufgenommenen

Massenspektren werden mit Hilfe des Incos-Datensystems gespeichert und ausgewertet. Dadurch kann für jede beliebige Retentionszeit das Massenspektrum der gerade eluierten Substanz abgerufen werden; außerdem besteht damit die Möglichkeit, das Elutionsprofil von beliebigen Massenfragmenten eines bestimmten m/z-Verhältnisses darzustellen (Massenfragmentographie bzw. single-ion-detection). Durch Aufsummierung aller registrierten Fragmentionen innerhalb der einzelnen Scans läßt sich ein Chromatogramm wie bei der Verwendung eines Flammenionisationsdetektors konstruieren (reconstructed-ion-chromatogram).

Gewöhnlich werden bei der Massenspektrometrie nur positive Ionen registriert; bei dem benützten Gerät besteht jedoch auch die Möglichkeit, negative Ionen aufzuzeichen, die unter bestimmten Bedingungen bei der chemischen Ionisation auftreten können (negative chemische Ionisation, NCI).

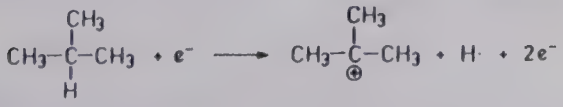
2.5.3.3.1. Massenspekrometrie bei Elektronenstoßionisation

In dieser Betriebsart werden durch die hohe Energie der erzeugten Elektronen die in der Ionenquelle befindlichen Moleküle in kleine Fragmente zerlegt. Je nach Molekülart bilden sich dabei charakteristische Fragmentionen, von denen auf die chemische Struktur des ursprünglichen Moleküls geschlossen werden kann. Molekülionen mit der Masse M^+ werden wegen der hohen Energie der Elektronen nur in Sonderfällen in nennenswerten Mengen gebildet; das Molekulargewicht der Ausgangsverbindung muß bei dieser Betriebsart in der Regel aus den Fragmenten erschlossen werden, was aber nicht immer möglich ist.

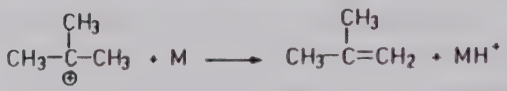
In unserem Fall hatten die Elektronen eine Energie von etwa 35 eV (Geräte-Optimum), Spektren wurden im Bereich zwischen m/z 50 und m/z 550 aufgenommen.

2.5.3.3.2. Chemische Ionisation mit Isobutan als Reaktantgas

In dieser Betriebsart entstehen durch Elektronenstoßionisation des Reaktantgases hauptsächlich Isobutylkationen, $C_4H_9^+$ (#186):



Das gebildete Isobutylkation kann nun unter Übertragung eines Protons mit einem von der GC-Säule eluierten Molekül reagieren:

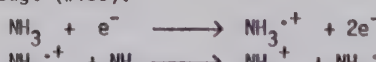


Bei diesem Prozeß wird im Vergleich zur direkten Elektronenstoßionisation weniger Energie auf das zu untersuchende Molekül übertragen, sodaß sich normalerweise hauptsächlich das protonierte Molekülion mit einer Masse M+1 bildet. Daher wird die chemische Ionisation primär zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet.

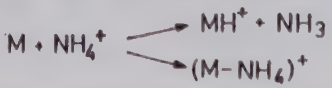
Die Energie der primären Elektronen betrug in unserem Gerät bei diesem Verfahren 100 eV. Das Reaktantgas stand in der Ionenquelle unter einem Druck von 0,24 Torr. Spektren wurden im Bereich von m/z 200 bis m/z 550 aufgenommen.

2.5.3.3.3. Chemische Ionisation mit Ammoniak als Reaktantgas

Eine noch schonendere chemische Ionisation gelingt mit Ammoniak als Reaktantgas. In diesem Fall werden durch die primären Elektronen vor allem Ammoniumionen erzeugt (#186):

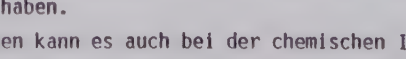


Die aus der Trennsäule kommenden Moleküle können bei entsprechender Struktur entweder ein Proton oder das ganze Ammoniumion addieren:



Welcher Fall dabei überwiegt, hängt von der Struktur des Moleküls ab. Im Massenspektrum wird damit ein Quasi-Molekülion die Masse M + 1 (MH^+) oder M + 18 ($M\text{-}NH_4^+$) haben.

Unter Umständen kann es auch bei der chemischen Ionisation zu einer Fragmentierung kommen, z.B. wenn das reagierende Molekül A ein leicht abspaltbares Heteroatom X enthält:



(RH = Reaktantgas)

Das Ausmaß der Fragmentierung hängt vom Verhältnis der Protonenaffinität zwischen Probenmolekül und Reaktantgas ab. Je höher die Protonenaffi-

nität des Reaktantgases ist, um so weniger Energie wird auf das Probenmolekül übertragen. Aus diesem Grund findet man bei Verwendung von Ammoniak (hohe Protonenaffinität) eine geringere Fragmentierung als beim Isobutan.

Bei der chemischen Ionisation mit Ammoniak herrschten folgende Bedingungen:
Energie der primären Elektronen: 100 eV
Reaktantgasdruck in der Ionenquelle: 0,24 Torr
Scanbereich: m/z 150 - m/z 500

2.5.3.3.4. Negative chemische Ionisation

Bei diesem Verfahren werden durch eine Umpolung der Beschleunigungsspannung nur negative Ionen registriert. Normalerweise sind negative Ionen instabil, da sie ihr Elektron leicht wieder verlieren. Daher eignet sich diese Methode nur bei Molekülen mit einer hohen Elektronegativität; die Massenspektrometrie in dieser Betriebsart ist damit in gleicher Weise selektiv wie die Elektroneneinfangdetektion (ECD, siehe 2.5.3.2.4.).
Im Unterschied zum ECD werden hier die thermischen Elektronen nicht durch Bestrahlung eines Hilfsgases erzeugt, sondern entstehen durch Elektronenstoßionisation aus dem Reaktantgas:

$$CH_4 + e^- \longrightarrow CH_3^+ + H^\bullet + 2e^-$$

Diese Elektronen, die eine geringere kinetische Energie als die primären Elektronen besitzen, können nun von Probenmolekülen mit entsprechender Elektronenaffinität eingefangen werden:

$$M + e^- \longrightarrow M^- \quad \text{(resonance capture)}$$

Oft dissoziieren die Moleküle beim Elektroneneinfang, etwa wenn sie Halogene enthalten, die selbst eine hohe Elektronegativität aufweisen:

$$RX + e^- \longrightarrow R^\bullet + X^-$$

Damit können mit dieser Methode halogenierte Verbindungen direkt nachgewiesen werden; andererseits fehlen in den Massenspektren solcher Verbindungen Fragmente des organischen Rests, die Hinweise auf die Struktur des Probenmoleküls geben könnten.

Bei der negativen chemischen Ionisation herrschten folgende Bedingungen:
Energie der primären Elektronen: 100 eV
Reaktantgas: Methan
Reaktantgasdruck in der Ionenquelle: 0,30 Torr
Scanbereich bei quantitativer Analyse von Cl- bzw. Br-haltigen Verbindungen:
m/z 32 - m/z 40 für Chlorionen; m/z 75 - m/z 85 für Bromionen
(beide Scannbereiche wurden nacheinander innerhalb von 1 sec periodisch durchlaufen)

2.5.3.3.5. Synthese von Trichlormethylstearinsäuremethylester als Vergleichssubstanz für die GC/MS-Analyse

Für Vergleichszwecke wurde Trichlormethylstearinsäuremethylester durch radikalische Addition von Trichlormethan an Ölsäuremethylester hergestellt (#77).

296,5 mg Ölsäuremethylester (1 mMol) wurden in 3 ml Trichlormethan gelöst und unter Rückflußkühlung bei leichtem Kochen erhitzt. Als Radikalstarter wurde Benzoylperoxid in 5 Portionen von je 2 mg zugesetzt. Nach 20 Stunden wurde die Reaktion beendet. Der Umsatz, bezogen auf die Abnahme des Gehalts an Ölsäuremethylester, betrug nach 2 Stunden etwa 5 Prozent, nach 20 Stunden etwa 90 Prozent. Ungefähr die Hälfte des Produktgemisches wurde portionsweise durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie aufgetrennt (Bedingungen siehe 2.5.3.2.2.). Die Fraktionen mit dem gesuchten Produkt, einem Gemisch von 8- und 9-Trichlormethylstearinsäuremethylestern, wurden vereinigt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und die isolierte Substanz nach dem Trocknen im Vakuum gewogen. Auf diese Weise wurden 28 mg des Trichlormethylstearinsäuremethylesters gewonnen.

Mit dieser Substanz wurde eine Standardlösung hergestellt, die pro ml n-Hexan 5 µg Trichlormethylstearinsäuremethylester (= 12 nMol/ml) und 0,343 µg Dibromstearinsäuremethylester (= 0,75 nMol/ml) enthielt.

2.5.3.3.6. Qantitative Bestimmung trichlormethylierter Fettsäuremethylester durch GC/MS

Die GC/MS-Analyse bei negativer chemischer Ionisation konnte zur quantitativen Bestimmung der in den Proben enthaltenen Trichlormethylfettsäuremethylester-Addukte eingesetzt werden. Dazu wurde zunächst das

Lösungsmittel in den Proben durch Vakuumzentrifugation (Speed-Vak-Zentrifuge) vollständig entfernt und durch 50 µl einer Lösung von Dibromstearinsäuremethylester in Hexan (5 mg/ml) ersetzt. Damit enthielten alle Proben 250 ng (0,548 nMol) der bromierten Verbindung als internem Standard. Bei der GC/MS-Messung der Proben wurden die negativen Ionen mit dem Masse-Ladungsverhältnis m/z = 35 (Cl^-) und m/z = 79 (Br^-) über die gesamte Trenndauer registriert und die Ionenmenge für die beiden Ionen getrennt gespeichert. Dieses Verfahren, das als "multiple ion detection" (MID) bezeichnet wird, lieferte ein Elutionsprofil der chlor- bzw. bromhaltigen Verbindungen (siehe Abb. 20).

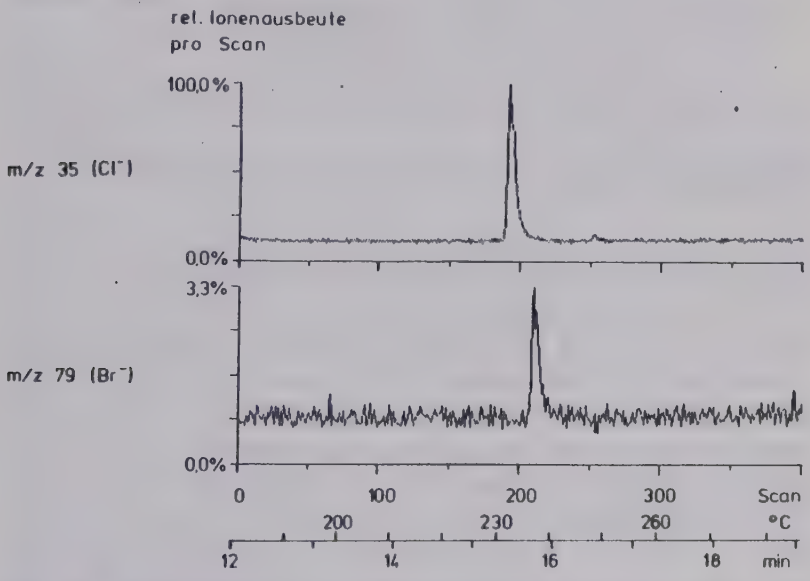


Abb. 20: GC/MS-Analyse einer Lösung von Trichlormethylstearinsäuremethylester (5 µg/ml) und Dibromstearinsäuremethylester (0,343 µg/ml) in Hexan bei negativer chemischen Ionisation
oben: Fragmentogramm des Chlorions (m/z 35)
unten: Fragmentogramm des Bromions (m/z 79)

Die in diesen Massenchromatogrammen vorkommenden Peaks konnten mit Hilfe des Datensystems integriert werden; die Peakflächen (Ionensummen) der Chlorionen wurden nun auf die Peakfläche der Bromionen bezogen. Auf die

gleiche Weise wurde eine Standard-Probe behandelt, die Dibrom- und Trichlormethyl-Stearinsäuremethylester in einem molaren Verhältnis von 1 : 16 enthielt (siehe 2.5.3.3.5.). Unter der Annahme, daß die relativen Ausbeuten bei der Bildung von negativen Ionen bei den untersuchten Fettsäuremethylester-Derivaten weder von der Struktur der Fettsäurereste noch von der absoluten Menge dieser Verbindungen abhängig sind, kann die Menge der Trichlormethyl-Verbindungen in der Probe folgendermaßen berechnet werden:

$$n_p = K \times n_i \times \Sigma Cl^- / \Sigma Br^-,$$

wobei n_p = Menge der Trichlormethyl-Verbindung in der Probe,
n_i = Menge des internen Standards (Br_2-Stearinsäure-ME) in der Probe
K = Proportionalitätsfaktor
ΣCl^- = Summe der Chlorionen in der Probe
ΣBr^- = Summe der Bromionen in der Probe.

Der Proportionalitätsfaktor K ließ sich aus den Meßergebnissen der Standard-Lösung berechnen und betrug 0,455; d.h. bezogen auf ein Mol ergab die Dibrom-Verbindung 0,455 mal weniger negative Ionen als die Trichlormethyl-Verbindung.

2.6. Inkubation von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A_2

2.6.1. Inkubation mit Phospholipase A_2 aus Schlangengift (Naja naja)

Phosphatidylcholin, das aus mikrosomalem Lipid durch säulenchromatographische Trennung an Kieselgel (2.5.2.2.) isoliert worden war, wurde in 10 ml einer Diethylether - Methanol - Mischung (95:5; v/v), der als Antioxidans einige Körnchen BHT zugesetzt waren, gelöst. Die enzymatische Hydrolyse wurde in einem 25-ml-Rundkolben durch Zugabe von 1 ml Phospholipaselösung gestartet. In einer Schüttelapparatur wurden die beiden Phasen 12 Stunden bei 25°C durchmischt, dann wurde die Etherphase abgehoben und die wässrige Phase zweimal mit 5 ml Ether nachextrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden am Rotationsverdampfer eingeegnt und der Rückstand in 5 ml Methanol gelöst.

Phospholipase-Lösung:
10 µg lyophilisierte Phospholipase A_2 (ca. 4 Units des Enzyms) gelöst in 10 ml Pufferlösung

Pufferlösung:
Boratpuffer 125 mM, pH 9
Calciumchlorid 10 mM

2.6.2. Inkubation mit Phospholipase A_2 aus Schweine-Pankreas

Phosphatidylcholin wurde aus Mikrosomen, die mit radioaktiv markiertem Tetrachlormethan inkubiert worden waren, isoliert und durch Dünnschichtchromatographie gereinigt (2.5.2.1.).

Zu 2,4 µMol - bezogen auf den Phosphatgehalt - einer so erhaltenen Phosphatidylcholin-Lösung wurden 2,4 µMol Heptadecansäure als interner Standard für die Fettsäurebestimmung zugesetzt und in einem Erlenmeyer-Kölbchen zur Trockne eingedampft, anschließend in 15 ml Inkubationspuffer (100 mM Tris-HCl, 5 mM Calciumchlorid, 6 mM Natriumchlorid; pH 7,9) unter Ultraschallbehandlung emulgiert und 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Nach Entnahme von dreimal 1 ml Inkubationsmedium (0-min-Wert) wurden zum Start der Reaktion 48 µl der Phospholipase-A_2-Suspension (390 Units bzw. 32 Units/ml Medium) in das Inkubationsgefäß pipettiert. Nach 10, 20, 40 und 80 Minuten wurden jeweils dreimal 1 ml zur Analyse entnommen.

Die entnommenen Proben (1 ml) wurden sofort in gekühlte Zentrifugengläschen gegeben, die 3 ml Trichlormethan, 2 ml Methanol und 100 µl einer 0,1 M Natrium-EDTA-Lösung zur Komplexierung der Calciumionen enthielten. Nach gutem Durchmischen wurden die Proben zur schnelleren Phasentrennung kurz zentrifugiert und dann die wässrige Oberphase mit einer Pipette möglichst vollständig abgehoben und verworfen, die verbleibende organische Unterphase mit Trichlormethan - Methanol (3:2, v/v) auf ein Volumen von 5 ml verdünnt. Diese Lösung wurde zur Bestimmung der einzelnen Parameter folgendermaßen aufgeteilt:

400 µl für die Fettsäuremethylestersynthese mit Diazomethan (2.5.3.1.2.)
400 µl für die Fettsäuremethylestersynthese mit Methanol/BF_3 (2.5.3.1.1.)
500 µl für die Phosphatbestimmung (2.5.2.3.)
200 µl für die Radioaktivitätsbestimmung (2.7.)
Der Rest (3,5 ml) wurde für die dünnschichtchromatographische Trennung von Phosphatidylcholin, Lysophosphatidylcholin und freien Fettsäuren (2.5.2.1.) verwendet.

Zur Verhinderung einer unspezifischen, nichtenzymatischen Hydrolyse bzw. Methanolyse wurden die Aliquots für die Diazomethanveresterung und für die Dünnschichtchromatographie sofort unter Vakuum zur Trockne eingeengt (Speed-Vak-Zentrifuge) und der Rückstand in 0,3 ml Diethylether (Proben für die Diazomethanveresterung) bzw. in 1 ml Trichlormethan (Proben für die Dünnschichtchromatographie) aufgenommen.

2.7. Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität von [^{14}C]-markiertem Tetrachlormethan bzw. seiner Metaboliten wurde durch Flüssig-Scintillationszählung (LSC) in einem Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 3003, bestimmt.

Für lipophile, d.h. in Hexan gut lösliche Substanzen wurde folgende Scintillationslösung eingesetzt:

Toluol mit einem Zusatz von
2,5-Diphenyloxazol (PPO; 6 g/l) und
2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol) (POPOP; 50 mg/l)

Alle anderen Proben wurden in einem Scintillationscocktail mit folgender Zusammensetzung gemessen:

Toluol	66,7 Prozent (v/v)
Triton X-100	33,3 Prozent (v/v)
PPO	6 g/l
POPOP	50 mg/l

Als Zählgefäße wurden Polyethylenröhrchen mit einem Volumen von 5 ml benützt, die Zähldauer betrug in der Regel 10 Minuten pro Probe. Die Zählausbeute wurde durch die Kanalverhältnis-Methode bestimmt; hierzu war eine Quench-Korrekturkurve mit einem Quench-Standard-Satz der Firma NEN erstellt worden.

Proteinhaltige Proben wurden mit Protosol (NEN) hydrolysiert und nach Neutralisation mit 8 N Salzsäure im oben genannten Scintillationscocktail ausgezählt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Wirkung von Arachidonsäure und ihrem Hydroperoxid auf Erythrozyten

3.1.1. Osmotische Fragilität

3.1.1.1. Kontrollversuche mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen

Da sowohl Arachidonsäure als auch das daraus synthetisierte Hydroperoxid in ethanolischer Lösung zur Erythrozyteninkubation eingesetzt wurde, wurde zunächst der Einfluß von Ethanol auf die osmotische Stabilität der Erythrozyten untersucht.

Abbildung 21 (oben) zeigt die osmotische Fragilität von Erythrozyten, die mit 5, 10, 20, 30 und 40 µl Ethanol entsprechend 2.3.2. dreißig Minuten lang inkubiert worden waren. Steigende Mengen Ethanol führten zu einer leichten Erhöhung der osmotischen Fragilität der Erythrozyten (vergleiche auch Tabelle 2), in der unverdünnten, isotonen Inkubationslösung selbst blieben die Erythrozyten aber stabil (Hämolyse unter 3 Prozent, siehe Tabelle 3). Der Ethanolzusatz führte entsprechend seiner Konzentration zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks in der Inkubationslösung, und zwar um 17 mOsm pro 10 µl Ethanol (theoretisch zu erwartender Wert: 16 mOsm pro 10 µl).

3.1.1.2. Inkubation mit Arachidonsäure

Von der ethanolischen Arachidonsäurelösung (3,6 mg/ml) wurden 5, 10, 20 und 30 µl mit den Erythrozyten inkubiert, entsprechend einer Konzentration von 5,5; 11; 22 und 33 µM Arachidonsäure in der Inkubationslösung.

Wie aus Abbildung 21 (Mitte) ersichtlich ist, führten die Inkubationen mit Arachidonsäure-Konzentrationen bis 11 µM zu keiner erhöhten osmotischen Fragilität der Erythrozyten, die Arachidonsäure scheint die Erythrozytenmembran in diesem Konzentrationsbereich eher zu stabilisieren (vergleiche Ethanol-Kontrollen). Bei einer Konzentration von 22 µM war dagegen eine deutliche Steigerung der osmotischen Fragilität sichtbar (siehe auch Tabelle 2), bereits in der unverdünnten Inkubationslösung lag nach 30 Minuten die Hämolyse mit 14 Prozent deutlich über den Kontrollwerten. Bei einer Arachidonsäure-Konzentration von 33 µM hämolysierten die Erythrozyten während der Inkubation vollständig.

3.1.1.3. Inkubation mit 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

Zur Untersuchung des Einflusses von Fettsäurehydroperoxiden auf die Erythrozytenmembran wurde die aus der Arachidonsäure synthetisierte 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (15-HPETE, siehe 2.2.) in Konzentrationen von 24,6 µM und 98,4 µM (10 bzw. 40 µl einer 26,4 mM Hydroperoxidlösung) mit Erythrozyten 30 Minuten lang inkubiert.

Im anschließenden osmotischen Fragilitätstest (Abb. 21 unten bzw. Tab. 2) unterschied sich die Resistenz der Erythrozyten bei einer HPETE-Konzentration von 24,6 µM nicht von den Kontrollexperimenten mit 10 µl Ethanol. Bei einer HPETE-Konzentration von 98,4 µM war die osmotische Fragilität der Erythrozyten gegenüber den Kontrollen mit 40 µl Ethanol gesteigert, lag aber noch unterhalb der Werte des entsprechenden Experiments mit 22 µM Arachidonsäure; in der unverdünnten Inkubationslösung lag der Hämolysegrad dabei unter fünf Prozent. Selbst bei einem Zusatz von 60 µl der HPETE-Lösung (147 µM im Inkubat) war nach 30-minütiger Inkubation in der unverdünnten Erythrozytenlösung keine gesteigerte Hämolyse feststellbar (siehe 3.1.2.).

Die hämolytische Eigenschaft der 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure ist demnach im Vergleich zur Arachidonsäure deutlich geringer ausgeprägt: Um die gleiche hämolytische Wirkung wie bei der Arachidonsäure zu erhalten, müssen von der 15-HPETE mehr als vierfach höhere Konzentrationen eingesetzt werden.

Tabelle 2:
Osmolalität bei 50-prozentiger Hämolyse von Erythrozyten bei Zusatz von Arachidonsäure und 15-HPETE in ethanolischer Lösung
(aus Abb. 21 extrapolierte Werte):

Methanol (Kontrolle)		Arachidonsäure		15-HPETE	
Menge	50% Hämolyse	Konzentr.	50% Hämolyse	Konzentr.	50% Hämolyse
5 µl	149 mOsm	5,5 µM	145 mOsm		
10 µl	166 mOsm	11,0 µM	143 mOsm	24,6 µM	163 mOsm
20 µl	176 mOsm	22,0 µM	273 mOsm		
30 µl	187 mOsm	33,0 µM	- (100%)		
40 µl	187 mOsm			98,4 µM	224 mOsm

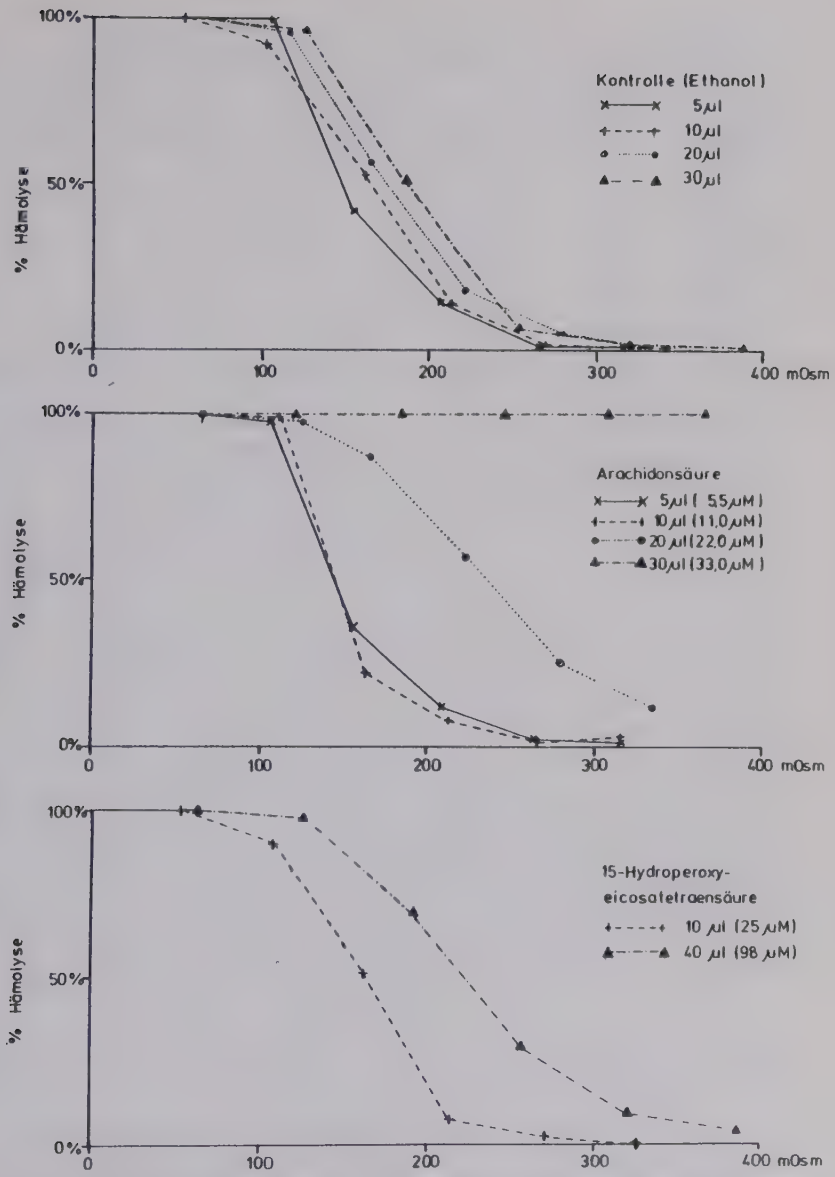


Abb. 21: Osmotische Fragilität von Erythrozyten nach 30-minütiger Inkubation mit Ethanol (oben) bzw. einer ethanolischen Lösung von Arachidonsäure (3,6 mg/ml; Mitte) und 15-HPETE (8,9 mg/ml; unten)

Tabelle 3:

Hämolysegrad in der unverdünnten (isotonen) Inkubationslösung

Methanol (Kontrolle)		Arachidonsäure		15-HPETE	
Menge	Hämolysegrad	Konzentr.	Hämolysegrad	Konzentr.	Hämolysegrad
5 µl	1 %	5,5 µM	1 %		
10 µl	1 %	11,0 µM	4 %	24,6 µM	1 %
20 µl	1 %	22,0 µM	14 %		
30 µl	1 %	33,0 µM	100 %		
40 µl	1 %			98,4 µM	4 %

3.1.2. Methämoglobinbildung durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

Bei der Inkubation von 40 µl der 15-HPETE-Lösung (Konzentration im Test 98,4 µM) zeigten die Erythrozyten bei Versuchsende eine deutliche Braunfärbung, was auf die Bildung von Methämoglobin (MetHb) hinwies. Dies konnte durch spektroskopische Messungen bestätigt werden (siehe Abb. 22).

Die MetHb-Bildung wurde quantitativ nach 30-minütiger Inkubation von Erythrozyten mit drei verschiedenen HPETE-Konzentrationen nach der unter 2.3.4. beschriebenen Methode bestimmt. Um festzustellen, ob die Hämolyse einen Einfluß auf die MetHb-Bildung hat, wurden zwei parallele Versuchsreihen durchgeführt: Im ersten Fall wurden die Erythrozyten wie üblich in isptoner Lösung mit 15-HPETE inkubiert; die Hämolyse lag bei diesen Experimenten nach 30 Minuten in allen Versuchsansätzen unter fünf Prozent, die MetHb-Bestimmung erfolgte aus den abzentrifugierten Erythrozyten. Im zweiten Fall wurden die Erythrozyten in hypotoner Lösung mit 15-HPETE inkubiert, wobei innerhalb weniger Minuten eine vollständige Hämolyse eintrat. In beiden Versuchsreihen betrugen die HPETE-Konzentrationen 0, 49, 98 und 147 µMol/l; die in den Erythrozyten vorhandene Hämoglobin-Menge betrug im Inkubationsansatz (10,75 ml) zu Versuchsbeginn 860 $\pm$ 28 nMol.

Die ermittelten Werte der MetHb-Bestimmung dieser Experimente sind in Abbildung 23 bzw. Tabelle 4 dargestellt. Die durch 15-HPETE ausgelöste MetHb-Bildung betrug bei intakten Erythrozyten im Mittel 0,33 Mol MetHb pro Mol Hydroperoxid, was einer Oxidation von 1,3 Mol Eisen(II)-Ionen zu Eisen(III)-Ionen entspricht. Im Hämolysat war die MetHb-Bildung um etwa die Hälfte geringer: pro Mol 15-HPETE wurden 0,16 Mol MetHb bzw. 0,6 Mol Eisen(III)-Ionen gebildet.

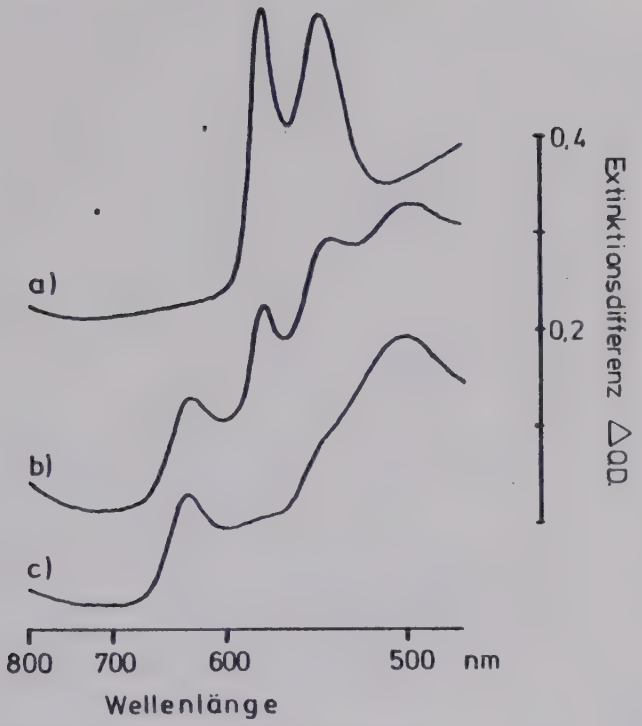


Abb. 22: Methämoglobin-Bildung durch 15-HPETE
Spektren von verdünnten Erythrozytenhämolysaten bei pH 6
a) vor der Inkubation (HbO_2-Spektrum)
b) nach Inkubation mit 15-HPETE (Mischtyp HbO_2-/MetHb-Spektrum)
c) nach Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (MetHb-Spektrum)
(aufgenommen mit Zeiss Spektrophotometer RPQ 20)

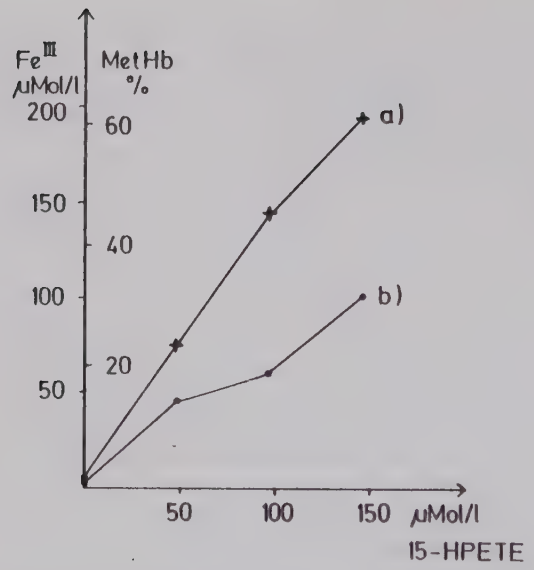


Abb. 23: MetHb-Bildung durch 15-HPETE nach 30-minütiger Inkubation
a) mit intakten Erythrozyten
b) mit zuvor hämolysierten Erythrozyten

Tabelle 4:

Methämoglobin-Bildung durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

a) in intakten Erythrozyten			
15-HPETE-Konzentr.	% MetHb	MetHb-Konzentr.	Fe^{3+}-Konzentr.
0 µM	1,3 %	1,0 µM	4,1 µM
49 µM	23,8 %	18,9 µM	75,6 µM
98 µM	43,9 %	36,1 µM	144 µM
147 µM	60,9 %	48,7 µM	195 µM
b) in hämolysierten Erythrozyten			
15-HPETE-Konzentr.	% MetHb	MetHb-Konzentr.	Fe^{3+}-Konzentr.
0 µM	0,5 %	0,4 µM	1,7 µM
49 µM	14,5 %	11,4 µM	45,6 µM
98 µM	19,2 %	14,8 µM	59,4 µM
147 µM	32,7 %	25,1 µM	100,6 µM

3.1.3. Rolle von Fettsäurehydroperoxiden bei der Hämolyse

In der Frage, welche Substanzen für die Erythrozytenschädigung im Hämolysemodell verantwortlich sind, gibt es in der Literatur unterschiedliche Vorstellungen. Ugazio et al. (#177), Willis et al. (#191) und Glende (#55) vermuteten, daß Fettsäurehydroperoxide, die bei der mikrosomalen Lipidperoxidation entstehen, für die Erythrozytenschädigung verantwortlich seien. Für diese Möglichkeit sprachen Untersuchungen von Shimasaki & Privett (#157) und die Versuche von Ugazio et al. (#177), bei denen eine Hämolyse von Erythrozyten durch die Inkubation mit Linolsäurehydroperoxid ausgelöst werden konnte. Shimasaki & Privett stellten außerdem fest, daß dabei starke Veränderungen in der Erythrozytenmembran stattfanden, u.a. ein Verlust der polyungesättigten Fettsäuren, Arachidonsäure und Docosahexaensäure, ein Verlust von Phosphatidylcholin, die Bildung von fluoreszierendem Material und die Oxidation von Tocopherol; Hämoglobin schien dabei keinen Einfluß auf die Membranveränderungen zu haben. Das Ausmaß der Hämolyse war von der zugegebenen Menge an Linolsäurehydroperoxid abhängig, genaue Zahlen sind aber nicht veröffentlicht. Shimasaki & Privett arbeiteten jedoch mit wesentlich höheren Konzentrationen an Fettsäurehydroperoxiden (ca. 20 mM) und an Erytrozyten (ca. 12,5 ml gepackte Erythrozyten pro 100 ml), entsprechend einem Verhältnis von 160 µMol Fettsäurehydroperoxid pro ml gepackter Erythrozyten, während in dieser Arbeit Konzentrationen von 5 bzw. 20 µMol Fettsäurehydroperoxid pro ml gepackter Erythrozyten verwendet wurden.

Ugazio et al. (#177) fanden eine Hämolyse bei der Inkubation von Erythrozyten mit Linolsäurehydroperoxid in Konzentrationen ab 240 µM; die Erythrozytenkonzentration bei diesen Versuchen ist in ihrer Veröffentlichung nicht angegeben. Obwohl Linolsäure in einer ihrer Tabellen auch aufgeführt ist, wurde ihr Einfluß auf die Hämolyse offensichtlich nicht untersucht.

Aus der hier vorgelegten Arbeit geht hervor, daß die aus Arachidonsäure synthetisierte 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure zwar hämolytische Eigenschaften besitzt, allerdings in geringerem Maß als die Arachidonsäure selbst. Die Einführung der Hydroperoxygruppierung in das Molekül ist also nicht für die hämolytische Wirkung verantwortlich. Der Unterschied der hämolytischen Eigenschaft zwischen beiden Substanzen läßt sich zwanglos aus den physiko-chemischen Eigenschaften dieser Verbindungen erklären: Arachidonsäure hat als amphipathisches Molekül Detergenz-Charakter und wird sich daher vorwiegend in die Erythrozytenmembran einlagern, wobei der Chole-

sterin-Phospholipid-Verband aufgelockert wird. Durch die Einführung der Hydroperoxygruppierung in den Fettsäurerest wird der lipophile Charakter des Moleküls vermindert, d.h. das Verteilungsgleichgewicht zwischen Phospholipidmembran und hydrophiler Umgebung wird sich für die Hydroperoxyverbindung zugunsten der hydrophilen Phase verschieben, was zu einer Verminderung seiner Konzentration in der Membran im Vergleich zur Arachidonsäure führt. Daß das Hydroperoxid die Zellmembran ohne Schädigung passieren kann, geht auch aus seiner Fähigkeit zur Methämoglobin-Bildung in nicht hämolysierten Erythrozyten hervor.

Die hier vorgelegten Ergebnisse stehen im Einklang zu Untersuchungen von Schulze (#152), bei denen in einem vergleichbaren Inkubationssystem der Einfluß verschiedener ungesättigter Fettsäuren (Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure) auf die Erythrozytenhämolyse gemessen wurde. Schulze stellte mit diesen Fettsäuren eine hämolytische Wirkung bei Konzentrationen ab etwa 50 µM fest. Ein Zusatz von Lipoxidase hatte dabei keine Verstärkung der Hämolyse zur Folge, weder bei der Inkubation von Erythrozyten mit den genannten Fettsäuren, noch bei der Inkubation mit Mikrosomen, was ebenfalls gegen die Beteiligung von Fettsäurehydroperoxiden bei diesem Prozeß spricht.

Als stark hämolysierende Verbindungen sind seit langem Monoacylphosphatide bekannt, die wegen dieser Eigenschaft auch den Namen Lysophosphatide erhalten haben. Mit Lysophosphatidylcholin fand Schulze schon bei einer Konzentration von 3 µg/ml, entsprechend 6 µM, eine deutliche Hämolyse. Für seine Vermutung, daß Lysophosphatide für die hämolytische Wirkung peroxidierter Mikrosomen verantwortlich sind, sprachen auch unsere Untersuchungen zur mikrosomalen Phospholipidzusammensetzung, die eine deutliche Zunahme von Lysophosphatiden als Folge zur durch Fe^{2+}-Ionen und NADPH induzierten Lipidperoxidation erkennen lassen (siehe 3.3.2.). Die Entstehung dieser Lysophosphatide kann durch Abspaltung peroxidierter Fettsäuren aus den entsprechenden Phospholipiden erklärt werden.

Der Haupteffekt, der in den hier vorgelegten Untersuchungen bei der Inkubation von Erythrozyten mit 15-HPETE auftrat, war die Bildung von Methämoglobin, ohne daß dabei zwangsläufig eine Hämolyse stattfand. Prinzipiell ist die Bildung von Methämoglobin bei der Reaktion mit Hydroperoxiden bekannt, so etwa mit Wasserstoffperoxid (#76). Ebenso ist bekannt, daß Fettsäurehydroperoxide in Gegenwart Eisen-haltiger Proteine schnell zerstört werden (#109). Für die Reaktion der 15-HPETE mit den Eisenionen im Hämo-

globin kann folgender Fenton-Mechanismus angenommen werden:

$$ROOH + Hb\text{-}Fe^{2+} \longrightarrow RO^{\cdot} + OH^{-} + Hb\text{-}Fe^{3+}$$

Da in den nicht hämolysierten Erythrozyten pro Molekül Fettsäurehydroperoxid mehr als ein Fe^{2+}-Ion im Hämoglobin oxidiert wurde, reagiert das entstandene Fettsäure-Oxy-Radikal offenbar teilweise mit Hämoglobin weiter:

$$RO^{\cdot} + Hb\text{-}Fe^{2+} \longrightarrow RO^{-} + Hb\text{-}Fe^{3+}$$

Möglicherweise läßt sich die geringere Methämoglobin-Bildung im Fall der hämolysierten Erythrozyten darauf zurückführen, daß hier die lokale Hämoglobin-Konzentration geringer ist als in den intakten Erythrozyten, die gebildeten Fettsäure-Oxy-Radikale also vorwiegend mit anderen Komponenten abreagieren. Außerdem muß beachtet werden, daß die Inkubationslösung EDTA enthielt, was eine verstärkte Rückbildung von Oxyhämoglobin bei der Inkubation mit hämolysierten Erythrozyten bewirkt haben könnte (#148).

Die hämolytische Wirkung von 15-HPETE tritt erst bei relativ hohen Konzentrationen auf, bei denen die Methämoglobin-Bildung schon deutlich zu erkennen ist. Aus der Literatur gibt es jedoch keine Hinweise auf eine Methämoglobin-Bildung bei der durch peroxidierte Mikrosomen ausgelösten Hämolyse, was ebenfalls dagegen spricht, daß für diesen Prozeß Fettsäurehydroperoxide verantwortlich sind.

Die bei hohen Hydroperoxid-Konzentrationen beobachtete Hämolyse könnte theoretisch auch durch Zersetzungsprodukte hervorgerufen worden sein, die bei der Reaktion des Hydroperoxids mit dem Hämoglobin entstanden waren. Ähnliche Zersetzungsprodukte sind in peroxidierten Mikrosomen durch Reaktion der Fettsäurehydroperoxide mit freien Eisenionen bzw. mit Cytochrom P-450 zu erwarten. Im Vergleich zur Arachidonsäure und den Lysophosphatiden wäre ihre hämolytische Wirkung jedoch recht gering.

Es stellt sich hier auch die Frage, ob die Hämolyse ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Schädigungsprozesse bei der mikrosomalen Lipidperoxidation darstellt. Durch den Zusatz von Erythrozyten wird das bereits artifizielle mikrosomale System noch unphysiologischer. Zur Untersuchung der Mechanismen, die als Folge der Lipidperoxidation bzw. der CCl_4-Metabolisierung zur Schädigung von Biomembranen führen, dürfte der Einsatz von Hepatozyten hier wesentliche Vorteile bieten.

3.2. Wirkung von 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure auf mikrosomale Cytochrome

3.2.1. Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung

Der Einfluß von Fettsäurehydroperoxiden auf Cytochrom P-450 wurde zunächst anhand der Hemmwirkung der 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure auf die mikrosomale N-Demethylierung von Ethylmorphin im Vergleich zur Arachidonsäure untersucht. Die Kinetik dieser Reaktion kann durch die Bildung von Formaldehyd verfolgt werden, der nach der Methode von Nash einfach zu bestimmen ist (siehe 2.4.3.).

3.2.1.1. Kinetik der ungehemmten mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung

Bei der Inkubation von Mikrosomen in Gegenwart des NADPH-regenerierenden Systems gemäß 2.4.3.1. wurde auch ohne Substratzugabe nach 20 Minuten eine Formaldehydbildung von ca. 30 nMol pro mg mikrosomalem Protein gefunden. Diese endogene Formaldehydbildung wurde weder durch Arachidonsäure noch durch 15-HPETE gehemmt und war auch bei gealterten Mikrosomen, die mit Ethylmorphin nur noch eine geringe Demethylierungsaktivität zeigten, in gleicher Größe vorhanden. Es ist offenbar, daß es sich dabei um eine unabhängig vom Cytochrom P-450 ablaufende Reaktion handelte. Zur Bestimmung der ausschließlich Ethylmorphin-abhängigen Formaldehyd-Bildung wurde daher bei jeder Meßreihe ein Inkubationsansatz ohne Ethylmorphin mitgeführt und die Meßwerte um den dabei ermittelten Betrag der endogenen Formaldehydbildung korrigiert.

Insgesamt wurden sechs Meßreihen durchgeführt, wobei die Substratkonzentration jeweils gemäß 2.4.3.1. zwischen 0 und 1 mM Ethylmorphin variiert wurde. Die Konzentration des aus dem Ethylmorphin entstandenen Formaldehyds wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta P = \frac{\Delta E - \Delta Eo}{\varepsilon_{412}} \times VF$$

ΔP = Konzentration der Ethylmorphin-abhängigen Formaldehydbildung nach 20 min Inkubation (Produktkonzentration)

ΔE = Extinktionsdifferenz der Ethylmorphin-haltigen Probe zwischen 0 und 20 min

ΔEo = Extinktionsdifferenz der Probe ohne Ethylmorphin zwischen 0 und 20 min

ε_{412} = molarer Extinktionskoeffizient von 3,5-Diacetyl-1,4-dihydrolutidin bei 412 nm ($8000\ M^{-1}cm^{-1}$)

VF = Verdünnungsfaktor der Probe bei der Formaldehydbestimmung (= 4)

Die Auftragung der Mittelwerte dieser Messungen nach der unter 2.4.3.3. beschriebenen Methode ergab mit guter Näherung eine Gerade (Abb. 24a), d.h. die Kinetik kann mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden.

Zur Berechnung der Maximalgeschwindigkeit V_{max}, bezogen auf den Gehalt an mikrosomalem Protein, und der Michaelis-Konstanten K_m wurde von jeder Meßreihe gemäß 2.4.3.3. eine Regressionsgerade berechnet und aus den Mittelwerten der dabei erhaltenen x-Achsenabschnitten bzw. Geraden-Steigungen V_{max} und K_m bestimmt. Für die ungehemmte Ethylmorphin-Demethylierung wurden dabei folgende Werte gefunden (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung):

V_{max} = 7,21 $\pm$ 0,47 nMol/mg Prot. pro Minute (n = 6)
K_m = 209 $\pm$ 17 µM (n = 6)

Diese Werte sind deutlich kleiner als diejenigen, die Pessayre und Mazel (#119) mit Rattenlebermikrosomen für die Ethylmorphin-Metabolisierung gefunden haben (V_{max} = 50 nMol/mg Prot. pro min; K_m = 800 µM). Pessayre und Mazel arbeiteten jedoch nicht mit reinen Lebermikrosomen, sondern mit dem 10.000-g-Überstand des Leberhomogenats, in dem noch alle cytosolischen Komponenten der Leberzelle enthalten sind, was möglicherweise für die Unterschiede verantwortlich sein könnte.

3.2.1.2. Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung durch Arachidonsäure

Die Hemmung von Arachidonsäure auf die mikrosomale Ethylmorphin-Demethylierung wurde entsprechend 2.4.3.1. mit Arachidonsäure-Konzentrationen von 71, 142 und 213 µM im Inkubationsmedium untersucht; mit jeder Hemmkonzentration wurden drei Meßreihen durchgeführt. Die Auswertung der Meßdaten erfolgte nach der gleichen Methode wie bei der ungehemmten Ethylmorphin-Kinetik; die Meßergebnisse sind in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

Tabelle 5:
Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung durch Arachidonsäure

Arachidonsäure-Konzentration	K_m app. µM	V_{max} app. nMol/mg Prot. pro min	Anzahl der Meßreihen
0 µM	209 $\pm$ 17	7,21 $\pm$ 0,47	(n = 6)
71 µM	397 $\pm$ 78	7,38 $\pm$ 1,18	(n = 3)
142 µM	539 $\pm$ 61	7,35 $\pm$ 1,91	(n = 3)
213 µM	987 $\pm$ 569	9,48 $\pm$ 1,93	(n = 3)

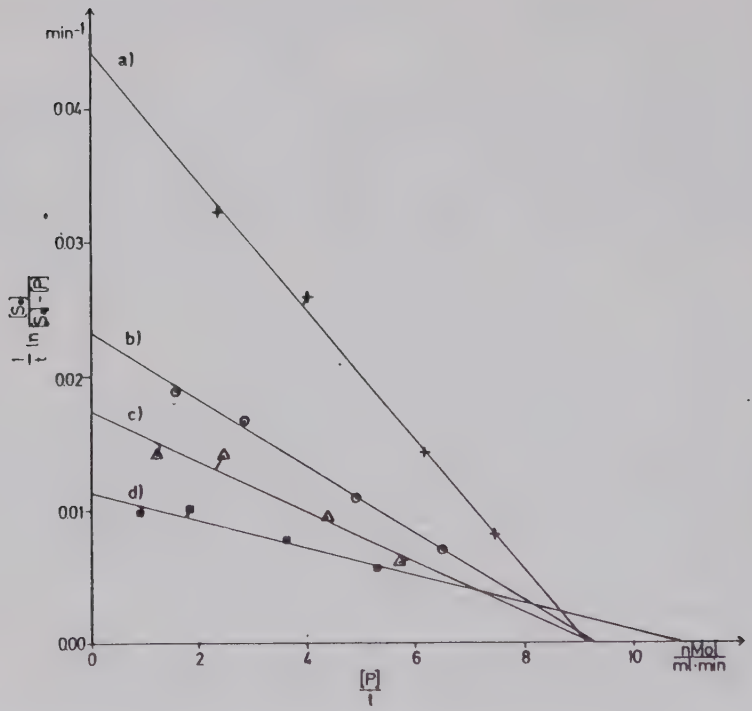


Abb. 24: Hemmung der oxidativen Ethylmorphin-Demethylierung in Mikrosomen druch Arachidonsäure (kinetische Analyse gemäß 2.4.3.3.)
a) ungehemmte Reaktion; b) 71 µM Arachidonsäure;
c) 142 µM Arachidonsäure; d) 213 µM Arachidonsäure

Die aus den einzelnen Meßreihen berechneten apparenten V_{max}- und K_m-Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt. Während der apparente K_m-Wert (reziproke Steigung in Abb. 24) mit steigender Arachidonsäure-Konzentration zunimmt, bleibt V_{max} (x-Achsenabschnitt) relativ konstant. Dieses Verhalten ist typisch für kompetitive Inhibitoren. Bei diesem Hemmtyp gilt die Beziehung:

$$K_{m\ app.} = \frac{K_m}{K_i} \times [I] + K_m,$$

wobei K_i als Dissoziationskonstante der Reaktion des Enzyms mit dem Inhibitor definiert ist:

$$E + I \rightleftharpoons EI \; ; \; Ki = \frac{[E] \times [I]}{[EI]}$$

In Abbildung 25 sind die in Tabelle 5 aufgeführten apparenten K_m-Werte gegen die Arachidonsäure-Konzentration aufgetragen. Läßt man den letzten Wert wegen seiner großen Standardabweichung unberücksichtigt, so erhält man für die Hemmkonstante K_i einen Wert von 93 µM.

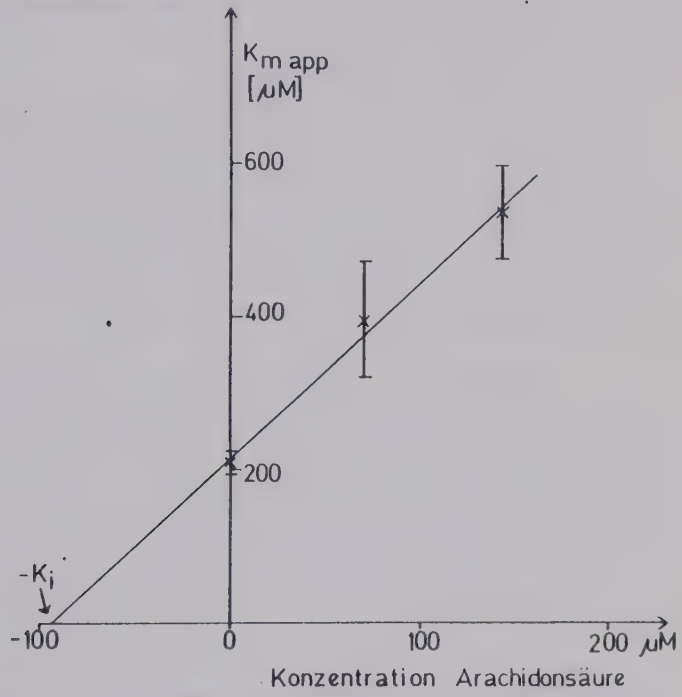


Abb. 25: Kompetitive Hemmung der oxidativen Ethylmorphin-Demethylierung durch Arachidonsäure: Ermittlung der Inhibitionskonstante K_i

Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß Fettsäuren durch das mikrosomale Monooxygenase-System in ω- und (ω-1)-Position hydroxyliert werden können (#128). Mit Laurinsäure ($C_{12:0}$) als Substrat fanden Das et al. (#30) für diese Reaktion in Lebermikrosomen von Sprague-Dawley-Ratten einen relativ

niedrigen K_m-Wert von 20 - 30 µM, was für eine physiologische Bedeutung dieser Reaktion spricht. Daher war es nicht überraschend, daß Arachidonsäure die mikrosomale Ethylmorphin-Demethylierung, die ebenfalls durch das Monooxygenase-System katalysiert wird, kompetitiv hemmt. Der gefundene Wert für die Inhibitionskonstante von Arachidonsäure (K_i = 93 µM) zeigt eine hohe Affinität des Cytochroms P-450 auch für diese Fettsäure. Pessayre et al. fanden in Mäuselebermikrosomen einen K_i-Wert von 250 µM Arachidonsäure für diese Reaktion (#120). Daß Arachidonsäure mit Ethylmorphin um die gleiche Bindungsstelle am Cytochrom konkurriert, geht auch daraus hervor, daß Arachidonsäure in Mikrosomen ein Cytochrom P-450-Bindungsspektrum vom Typ 1 ausbildet (#163).

Inzwischen wurden auch Studien veröffentlicht, die sich direkt mit der oxidativen Metabolisierung von Arachidonsäure durch Cytochrom P-450 beschäftigen (#23;#24;#26). Aus Bindungsspektren wurde dabei eine Dissoziationskonstante K_s von ca. 50 µM für die Bindung von Arachidonsäure an oxidiertes Cytochrom P-450 abgeleitet. Bei der Metabolisierung wurden äquimolare Mengen des Substrats, von NADPH und Sauerstoff umgesetzt; durch HPLC konnten verschiedene Reaktionsprodukte isoliert werden.

3.2.1.3. Hemmung durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

Für die Versuche zur Hemmung der Ethylmorphin-Demethylierung durch Fettsäurehydroperoxide wurde die nach 2.2. aus Arachidonsäure synthetisierte 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure in Konzentrationen von 11, 21 und 31 µM zur Inkubation eingesetzt. Wie bei den Versuchen mit Arachidonsäure wurden mit jeder dieser Konzentrationen drei Meßreihen durchgeführt, bei denen die Ethylmorphinkonzentrationen wie bei der ungehemmten Reaktion variiert wurden.

Die Meßergebnisse wurden entsprechend der unter 2.4.3.3. beschriebenen Methode ausgewertet und sind in Abb. 26 dargestellt. Bei 15-HPETE-Konzentrationen von 11 und 21 µM erhielt man aus den Meßpunkten Regressionsgeraden mit ähnlichen Steigungen ($1/K_m$) wie bei der ungehemmten Reaktion, die x-Achsenabschnitte (V_{max}) waren jedoch deutlich kleiner. Bei den recht kleinen Meßwerten in Gegenwart von 31 µM 15-HPETE ist die Berechnung einer Regressionsgeraden aber nicht mehr sinnvoll. Die berechneten apparenten V_{max}- und K_m-Werte sind in Tabelle 6 aufgefürt.

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei der Hemmung mit Arachidonsäure wurde hier die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} schon mit 11 µM des

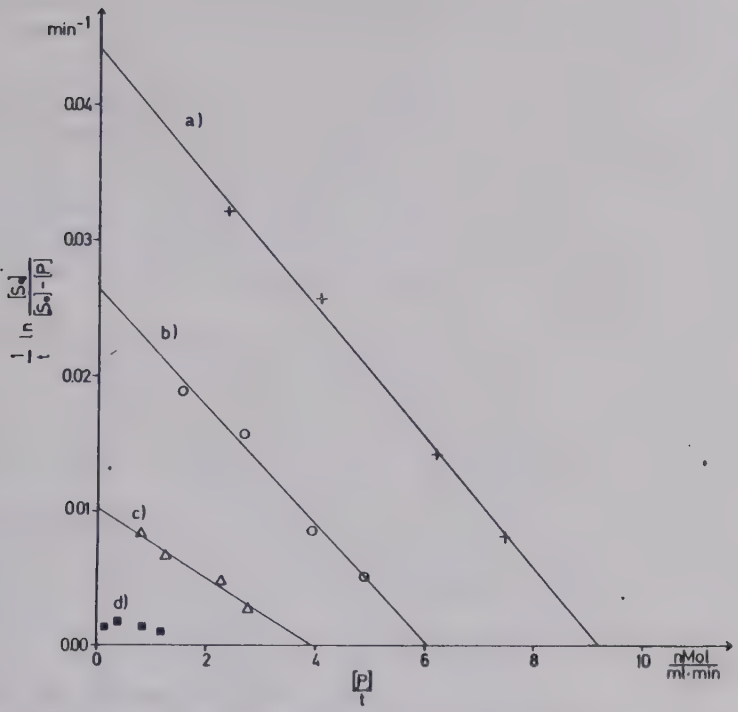


Abb. 26: Hemmung der oxidativen Ethylmorphin-Demethylierung durch 15-HPETE (kinetische Analyse gemäß 2.4.3.3.)
a) ungehemmte Reaktion; b) 11 µM 15-HPETE;
c) 21 µM 15-HPETE; d) 31 µM 15-HPETE

Tabelle 6:
Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung durch 15-HPETE

Konzentration von 15-HPETE	K_m app. µM	V_{max} nMol/mg Prot. pro min	Anzahl der Meßreihen
0 µM	209 ± 17	7,21 ± 0,47	(n = 6)
11 µM	230 ± 48	4,75 ± 0,66	(n = 3)
21 µM	399 ± 189	3,34 ± 0,65	(n = 3)

Hydroperoxids stark gehemmt, während der apparente K_m-Wert dabei noch relativ konstant blieb; höhere 15-HPETE-Konzentrationen beeinflußten möglicherweise auch den K_m-Wert, die Unterschiede sind hier wegen der höheren Standardabweichung aber nicht signifikant.

Eine Verminderung der Maximalgeschwindigkeit ohne Beeinflussung des K_m-Wertes liegt im Fall einer irreversiblen bzw. nichtkompetitiven Hemmung vor. 15-HPETE könnte also schon bei niedrigen Konzentrationen irreversibel mit dem Enzym reagieren oder aber an eine vom aktiven Zentrum unabhängige Bindungsstelle des Enzym unter Ausbildung eines inaktiven Komplexes binden; eine Unterscheidung zwischen beiden Möglichkeiten ist aus der Hemmkinetik allein nicht möglich.

Unter der Annahme einer nichtkompetitiven Reaktion gilt die Beziehung:

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{[I]}{V_{max} \times K_i} + \frac{1}{V_{max}}$$

Trägt man $1/V_{max}$ gegen $[I]$ auf, so erhält man aus dem x-Achsenabschnitt einen K_i-Wert von 18 µM für 15-HPETE (siehe Abb. 27a).

Bei irreversibler Hemmung hängt die Maximalgeschwindigkeit vom Gehalt an unzerstörtem Enzym ab, da V_{max} proportional zur Enzymkonzentration ist. Legt man einen linearen Zusammenhang zwischen der zugegebenen Menge der 15-HPETE und der zerstörten Enzymmenge zugrunde, so wären rund 38 nMol 15-HPETE pro ml zur vollständigen Enzyminaktivierung notwendig (siehe Abb. 27b), was bei einer Konzentration von 1,5 nMol Cytochrom P-450 pro ml einer Inaktivierung von einem Cytochrom-Molekül durch 25 Moleküle des Fettsäurehydroperoxids entspräche.

Auch wenn aus den kinetischen Daten keine eindeutige Zuordung zu einem definierten Hemmtyp möglich ist, so kann doch mit Sicherheit gesagt werden, daß die starke Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung bei niedrigen Konzentrationen des Fettsäurehydroperoxids auf anderen Mechanismen beruht als bei der kompetitiven Hemmung durch Arachidonsäure.

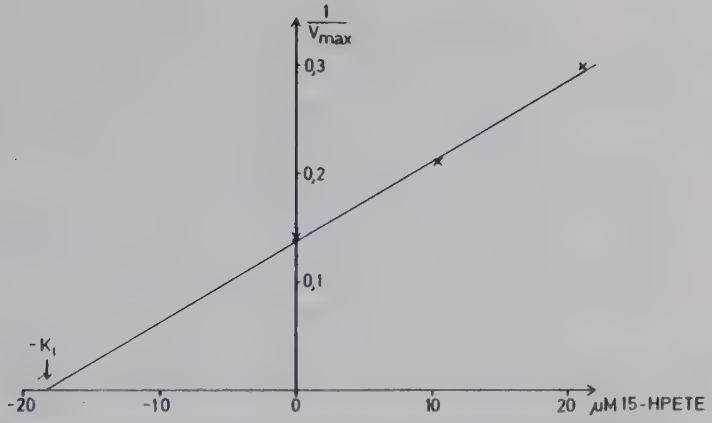


Abb. 27a: Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung durch 15-HPETE (Darstellung $1/V_{max}$ gegen [I])

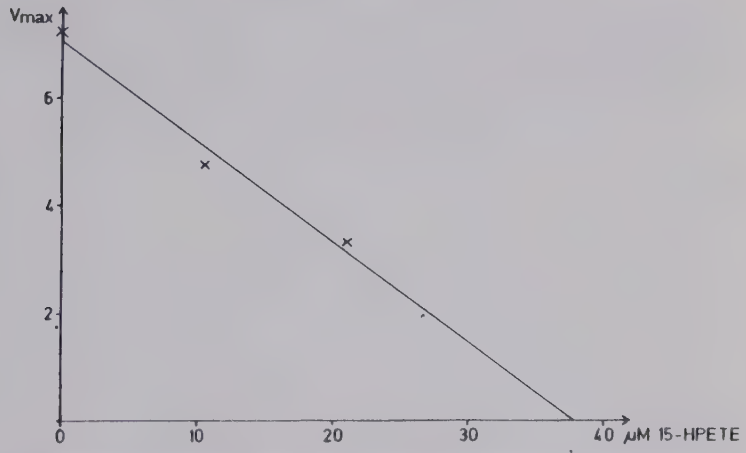


Abb. 27b: Hemmung der mikrosomalen Ethylmorphin-Demethylierung durch 15-HPETE (Darstellung V_{max} gegen [I])

3.2.2. Zerstörung von Cytochrom P-450 durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

Zur Untersuchung, in welchem Ausmaß Fettsäurehydroperoxide das zentrale Enzym der mischfunktionellen Oxygenase, Cytochrom P-450, direkt zerstören können, wurden Lebermikrosomen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure inkubiert.

Jeder Inkubationsansatz enthielt 12 ml einer Mikrosomensuspension in Pufferlösung (Tris-HCl 50 mM, KCl 120 mM, pH 7,5) mit einem Gehalt von 1,13 mg mikrosomalem Protein pro ml. Der anfängliche Gehalt an Cytochrom P-450 wurde zu 1,43 nMol/ml bestimmt (1,26 nMol/mg Protein). Nach 10, 30, 60 und 90 Minuten wurden jeweils 2 ml aus dem Inkubat entnommen und der Cytochrom P-450-Gehalt nach 2.4.2.2. bestimmt und mit dem einer Kontrollinkubation verglichen.

Abbildung 28a zeigt den zeitlichen Verlauf der Cytochrom P-450-Zerstörung bei unterschiedlichen 15-HPETE-Konzentrationen. Die Geschwindigkeit der Cytochrom-Zerstörung fiel nach zehn Minuten stark ab und kam nach 60 Minuten zum Stillstand. Das Verhältnis zwischen zugesetzter 15-HPETE-Menge und zerstörtem Cytochrom P-450 ist in Abbildung 28b dargestellt. Bis zu einer Zerstörung von etwa 0,5 nMol Cytochrom P-450 pro ml ließ sich ein linearer Zusammenhang zur 15-HPETE-Konzentration erkennen, eine weitere Steigerung der 15-HPETE-Konzentration führte zu einer assymptotischen Näherung an den maximal möglichen Grenzwert der vollständigen Cytochrom-P-450-Zerstörung. Aus der Steigung der Kurve im linearen Bereich läßt sich extrapolieren, daß zur Zerstörung von einem Molekül Cytochrom P-450 innerhalb von 60 Minuten etwa 40 Moleküle 15-HPETE benötigt werden.

Verursacht durch das Einfrieren der Mikrosomen nach ihrer Präparation enthielten die Inkubationsansätze einen Cytochrom P-420-Gehalt von etwa 0,15 nMol/ml, was etwa zehn Prozent der Cytochrom P-450-Konzentration entsprach. Bei der Behandlung mit 15-HPETE wurde dieses enzymatisch inaktive Cytochrom teilweise zerstört, eine genaue quantitative Auswertung dieses Prozesses war aber wegen der vergleichsweise geringen Cytochrom P-420-Konzentration nicht möglich.

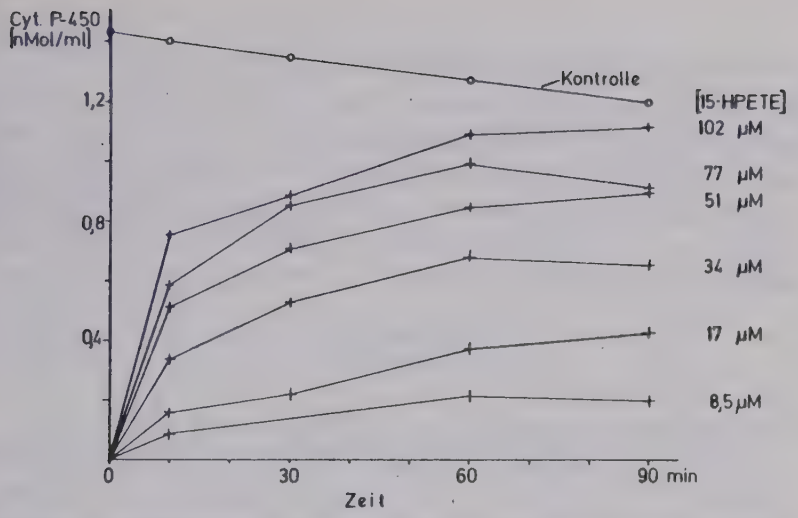


Abb. 28a: Zerstörung von Cytochrom P-450 in Mikrosomen durch 15-HPETE in Abhängigkeit von der Zeit. Aufgetragen sind die Differenzen im Cytochrom P-450-Gehalt der Proben gegenüber unbehandelten Kontrollen, in denen der Cytochrom-Gehalt ebenfalls im Verlauf der Inkubation langsam abnahm (siehe obere Linie).

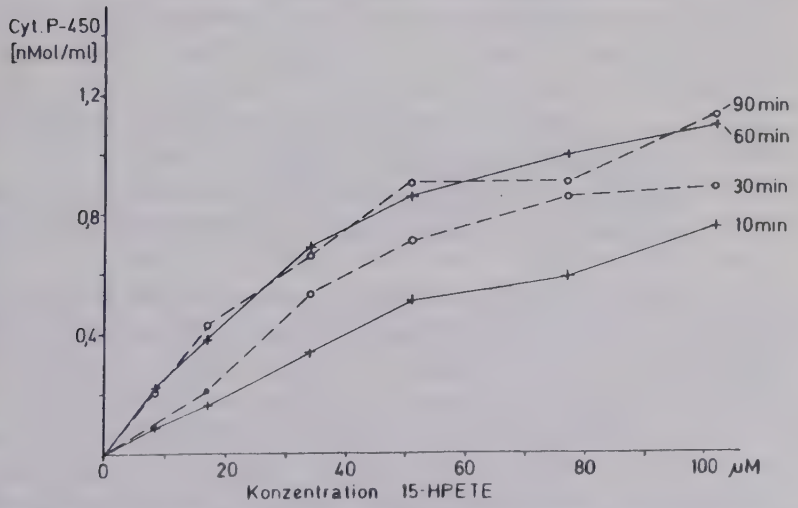


Abb. 28b: Zerstörung von Cytochrom P-450 in Mikrosomen in Abhängigkeit von der Konzentration an 15-HPETE

3.2.3. Zerstörung von Cytochrom b_5

Die Differenzspektren von Mikrosomen, die mit 15-HPETE inkubiert worden waren, gegen entsprechende Kontrollinkubationen ohne Zusatz von 15-HPETE nach Reduktion und Kohlenmonoxidsättigung beider Ansätze aufgenommen, zeigten neben der durch die Cytochrom P-450-Zerstörung hervorgerufenen Extinktionsabnahme im Bereich um 450 nm eine starke Extinktionsabnahme im Bereich von 420 bis 425 nm (siehe Abb. 29).

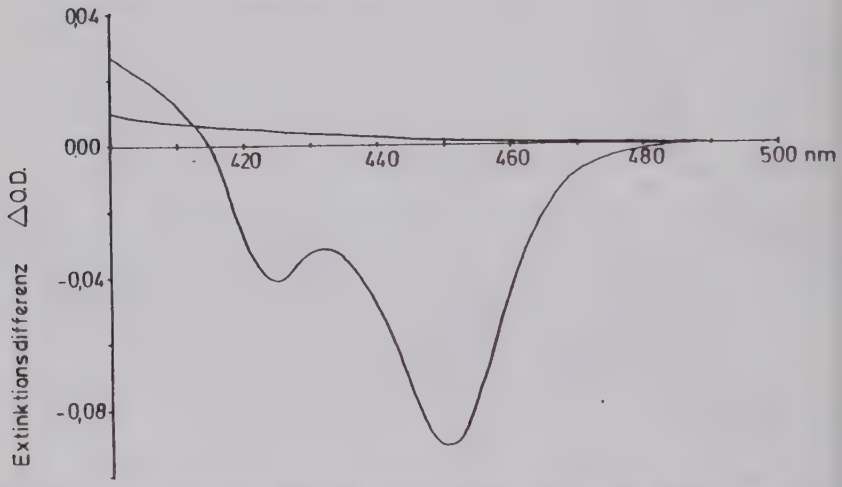


Abb. 29: Differenzspektrum von Rattenlebermikrosomen nach Reduktion mit Dithionit und Kohlenmonoxid-Sättigung
Probenküvette: Mikrosomen, 30 min inkubiert mit 108 µM 15-HPETE
Referenzküvette: Kontrollmikrosomen, 30 min inkubiert ohne HPETE

Eine Trogbildung in diesem Wellenlängenbereich war aus der beobachteten Zerstörung von Cytochrom P-420 zwar zu erwarten, das Ausmaß der Extinktionsabnahme und die Lage des Minimums bei 425 nm ist aber mit einer Zerstörung von Cytochrom P-420 allein nicht zu erklären. Dies ließ vermuten, daß die Extinktionsabnahme bei 425 nm mindestens teilweise durch eine Zerstörung von Cytochrom b_5 hervorgerufen sein könnte. Daher wurde die Zerstörung von Cytochrom b_5 durch 15-HPETE nach der unter 2.4.2.4. beschriebenen Methode direkt bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tabelle 7:

Zerstörung von Cytochrom b_5 durch 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

	Cytochrom b_5-Konzentration	Anteil gegenüber Kontrolle
Mikrosomensuspension vor der Inkubation (1 mg Protein/ml)	0,68 nMol/ml	
Inkubation ohne Hydroperoxid (60 min bei 37°C)	0,63 nMol/ml	100 %
Inkubation mit 50 µM 15-HPETE (60 min bei 37°C)	0,48 nMol/ml	76 %
Inkubation mit thermischen Zerfallsprodukten aus 50 nMol 15-HPETE pro ml (60 min bei 37°C)	0,58 nMol/ml	92 %

Danach führte eine Konzentration von 50 nMol/ml des Hydroperoxids innerhalb von 60 Minuten zur Zerstörung von 0,15 nMol Cytochrom b_5 pro ml. Damit war die Schädigung des Cytochroms b_5 geringer als diejenige von Cytochrom P-450, wo bei gleicher 15-HPETE-Konzentration 0,86 nMol/ml in 60 Minuten zerstört wurden.

3.2.4. Wirkung von thermischen Zerfallsprodukten der 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure auf mikrosomale Cytochrome

Da auch für Zersetzungsprodukte von Fettsäurehydroperoxiden eine spezifische Rolle im Schädigungsprozeß der Lipidperoxidation diskutiert wird (#14), wurde der direkte Einfluß von thermischen Zerfallsprodukten der 15-HPETE auf die mikrosomalen Cytochrome untersucht.

Zur Hitzebehandlung wurde das Hydroperoxid in Ethanol gelöst und dann in einem verschlossenen Reagenzglas zehn Minuten bei 80°C erhitzt. Abb. 30 zeigt das UV-Spektrum einer Lösung von 76 µM 15-HPETE vor bzw. nach einer solchen Hitzebehandlung. Eine Verdoppelung der Erhitzungsdauer führte zu keiner weiteren Veränderung des Spektrums. Die Zerfallsprodukte wurden nicht charakterisiert; das Auftreten eines Extinktionsmaximums bei 277 nm deutet auf Produkte mit konjugierter Trienstruktur hin, die z.B. bei der Umwandlung der Hydroperoxy-Gruppierung in eine Ketogruppe entstehen können.

Wurden Mikrosomen mit diesen Zerfallsprodukten inkubiert, wurde wesentlich weniger Cytochrom P-450 zerstört als mit 15-HPETE selbst (siehe Tab. 8). Ähnlich waren die Ergebnisse auch im Bezug auf die Schädigung von Cytochrom b_5, wie aus Tabelle 7 hervorgeht. 15-HPETE war in beiden Fällen mindestens dreifach wirksamer als seine Zerfallsprodukte. Demnach sind

offenbar nicht die Zerfallsprodukte, sondern die Fettsäurehydroperoxide selbst für die Zerstörung der mikrosomalen Cytochrome verantwortlich.

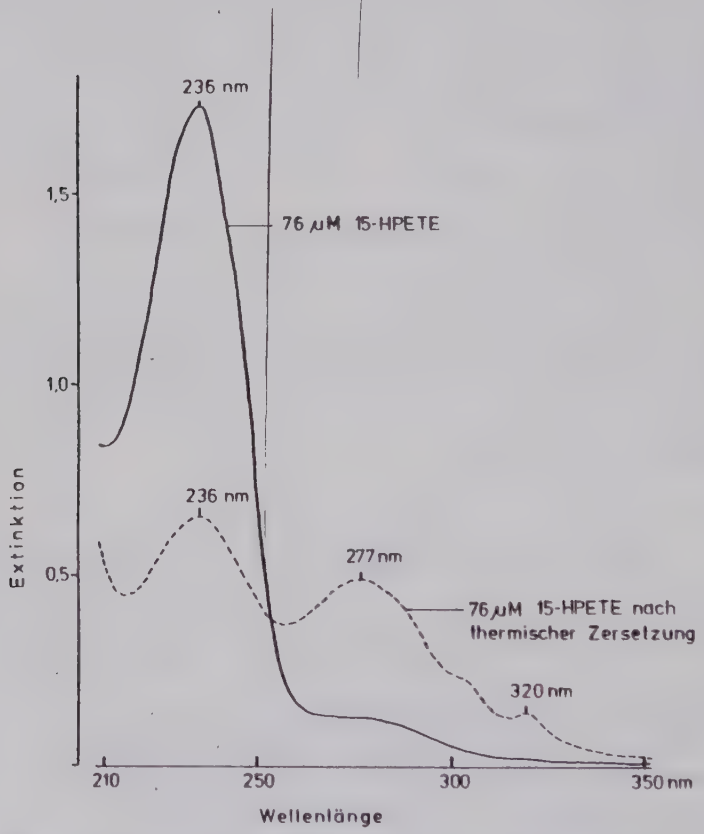


Abb. 30: UV-Spektrum von 15-HPETE (ausgezogene Linie) und ihren Zersetzungsprodukten nach zehnminütigem Erhitzen bei 80°C (gestrichelte Linie)

Tabelle 8:

Zerstörung von Cytochrom P-450 durch thermische Zerfallsprodukte der 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure

Mikrosomensuspension 1 mg Protein/ml; Cytochrom P-450-Gehalt 1,15 nMol/ml

	Abnahme Cyt. P-450 gegenüber Kontrolle	
Inkubation 10 min:		
15-HPETE (50 nMol/ml)	-0.60 nMol/ml	(-52 %)
therm. Zerfallsprodukte aus 50 nMol 15-HPETE/ml	-0,09 nMol/ml	(- 8 %)
Inkubation 30 min		
15-HPETE (50 nMol/ml)	-0,64 nMol/ml	(-56 %)
therm. Zerfallsprodukte aus 50 nMol 15-HPETE/ml	-0,20 nMol/ml	(-17 %)

3.2.5. Folgerungen

15-Hydroperoxyeicosatetraensäure hemmt die mikrosomale Ethylmorphin-Demethylierung nach den hier vorgelegten Untersuchungen schon bei deutlich geringeren Konzentrationen als Arachidonsäure, allerdings nach einem anderen Mechanismus. Aus der Enzymkinetik war nicht zu entscheiden, ob es sich hier um eine nicht kompetitive oder um eine irreversible Inhibition handelte. Durch direkte Messung des Cytochrom P-450-Gehalts in Mikrosomen konnte jedoch klar gezeigt werden, daß die Inkubation mit 15-HPETE zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Zerstörung von Cytochrom P-450 führte. Nach diesen Versuchen wurden für die Zerstörung von einem Molekül Cytochrom P-450 innerhalb von 60 Minuten etwa 40 Moleküle des Hydroperoxids benötigt, wogegen aus der Hemmkinetik der Ethylmorphin-Demethylierung abgeleitet wurde, daß zur Inaktivierung eines Moleküls Cytochrom P-450 nur ca. 25 Moleküle der 15-HPETE bei einem Meßzeitraum von 20 Minuten notwendig waren. Ähnliche Unterschiede zwischen Zerstörung von Cytochrom P-450 und der Inaktivierung seiner enzymatischen Funktion fanden auch Jeffery et al. bei Verwendung von Linolsäurehydroperoxid (#71;#72). Diese Unterschiede könnten dadurch erklärt werden, daß die enzymatische Inaktivierung nicht unbedingt zu einer Zerstörung des Cytochroms führen muß; außerdem wäre es denkbar, daß verschiedene Isoenzyme des Cytochroms gegenüber Fettsäurehydroperoxiden unterschiedlich empfindlich sind, speziell also die Ethylmorphin-demethylierende Cytochrom P-450-Spezies durch Fettsäurehydroperoxide geschädigt wird, was Jeffery et al. vermuten.

Seit Anfang der siebziger Jahre ist bekannt, daß Cytochrom P-450 als Oxidationsmittel bei der Substratoxidation auch Fettsäurehydroperoxide verwenden kann und somit auch Peroxidase-Eigenschaften besitzt (#68;#75). In diesem Fall übernimmt das Hydroperoxid die Rolle des Sauerstoffs und des Elektronendonators bei der "normalen" Monooxygenase-Reaktion des Cytochroms P-450:

$$R_1H + R_2OOH \xrightarrow{\text{Cytochrom P-450}} R_1OH + R_2OH$$

Statt Fettsäurehydroperoxide können auch andere organische Hydroperoxide wie Cumolhydroperoxid oder organische Persäuren, aber auch anorganische Verbindungen wie z.B. Natriumchlorit oder Natriumperiodat als Oxidationsmittel dienen (#188). Der genaue Mechanismus dieser Peroxidase-Reaktion ist zwar noch nicht völlig geklärt, vieles spricht jedoch dafür, daß dabei das Hydroperoxid unter Beteiligung des Thiolats, des fünften Eisenliganden im Cytochrom, homolytisch gespalten wird und anschließend vom Enzym-gebundenen Substrat ein geeignetes Wasserstoffatom abstrahiert (siehe Abb. 31):

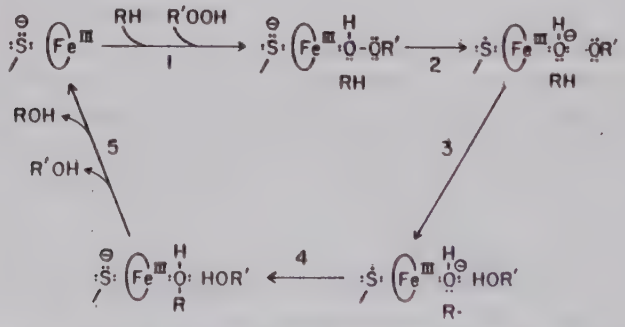


Abb. 31: Postulierter Mechanismus der Peroxid-abhängigen Hydroxylierung (nach #188)

Die Zerstörung des Cytochroms, die bei diesen Reaktionen häufig beobachtet wurde, kann nach diesem Mechanismus durch direkte Interaktion der radikalischen Spaltprodukte mit dem Porphyrin erklärt werden. Insbesondere bei Abwesenheit geeigneter oxidierbarer Substrate könnte der radikalische Zerfall der Fettsäurehydroperoxide und die damit verbundene Zerstörung des Cytochroms über diesen Mechanismus ablaufen.

Cytochrom b_5 kann nach den hier vorgelegten Untersuchungen durch 15-HPETE auch geschädigt werden, allerdings in einem geringeren Maß als Cytochrom P-450. Jeffery et al. (#72) fanden mit Linolsäurehydroperoxid dagegen keine Zerstörung dieses mikrosomalen Cytochroms.

Auf beide mikrosomalen Cytochrome hatten die thermischen Zerfallsprodukte der 15-HPETE einen wesentlich geringeren Einfluß als das Hydroperoxid selbst. Demnach ist es unwahrscheinlich, daß für die Inaktivierung der Cytochrome spezielle Zerfallsprodukte von Fettsäurehydroperoxiden verantwortlich sind, wie von einigen Autoren vermutet wurde (#14). Andererseits ist nicht auszuschließen, daß im mikrosomalen System andere Zerfallsprodukte aus Hydroperoxiden gebildet werden als bei der thermischen Zersetzung.

3.3. Mikrosomale Lipidperoxidation durch NADPH in Gegenwart von Eisenionen und ADP

Der Einfluß der mikrosomalen Lipidperoxidation auf den Gehalt an Cytochrom P-450 wurde am "klassischen" Modell der enzymatischen Lipidperoxidation, d.h. durch Inkubation von Mikrosomen mit NADPH in Gegenwart von Eisenionen untersucht. Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde dabei anhand der Abnahme polyungesättigter Fettsäuren, der Bildung von Thiobarbitursäure-reaktivem Material und der Entstehung der Kohlenwasserstoffe Ethan und Pentan verfolgt. Außerdem wurde an diesem Modell die durch Lipidperoxidation verursachten Veränderungen in der mikrosomalen Phospholipidzusammensetzung untersucht.

3.3.1. Peroxidation ungesättigter Fettsäuren und Zerstörung von Cytochrom P-450

14 ml einer Mikrosomensuspension mit einem Gehalt von 2 mg Protein pro ml wurden im geschlossen System mit Eisenionen und ADP in Gegenwart eines NAPDH-regenerierenden Systems inkubiert. Das Inkubationssystem war vor dem Start der Reaktion so lange mit synthetischer Luft gespült worden, bis keine Kohlenwasserstoffe mehr nachweisbar waren. 10 Minuten nach Reaktionsstart wurde die gebildete Kohlenwasserstoff-Menge gemessen, nach 12, 30 und 60 Minuten wurden jeweils Proben zur Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehalts, der Malonaldehydbildung und zur Bestimmung der Fettsäure-Zusammensetzung entnommen. Da für diese Entnahmen das Inkubationsgefäß geöffnet werden mußte, war eine Bestimmung der Kohlenwasserstoffmengen zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr sinnvoll.

Für die einzelnen Meßparameter ergaben sich dabei folgende Werte:

Cytochrom P-450-Gehalt der Mikrosomen:

Mikrosomenlösung bei Versuchsbeginn:	1,21 nMol Cyt. P-450 / mg Protein
nach 12 Minuten Inkubation:	0,82 nMol Cyt. P-450 / mg Protein
nach 30 Minuten Inkubation:	0,69 nMol Cyt. P-450 / mg Protein
nach 60 Minuten Inkubation:	0,60 nMol Cyt. P-450 / mg Protein

Fettsäure-Zusammensetzung im Lipidextrakt der Mikrosomen

(gaschromatographische Bestimmung nach Umesterung zu den entsprechenden Fettsäuremethylestern; molares Verhältnis bezogen auf Stearinsäure; [Mol FSME/Mol $C_{18:0}$]; siehe Abbildung 32):

	16:0	18:0	18:1c	18:2	20:4	22:6
frisch präparierte Mikrosomen	0,81	1,00	0,15	0,52	1,06	0,23
bei Versuchsbeginn	0,85	1,00	0,13	0,54	1,07	0,25
nach 12 Minuten	0,85	1,00	0,13	0,54	0,98	0,19
nach 30 Minuten	0,87	1,00	0,14	0,55	0,91	0,15
nach 60 Minuten	0,85	1,00	0,14	0,51	0,76	0,15

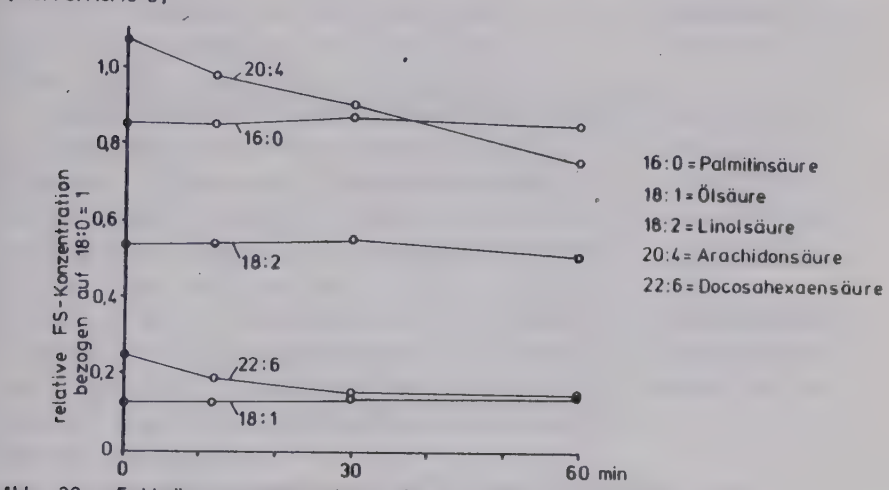


Abb. 32: Fettsäurezusammensetzung in peroxidierten Mikrosomen, bezogen auf den Gehalt an Stearinsäure (18:0)

Die Relationen der Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1) und Linolsäure (18:2) zueinander blieben während der Inkubation nahezu konstant, im Vergleich dazu nahmen die relativen Mengen an Arachidonsäure (20:4) und Docosahexaensäure (22:6) mit zunehmender Inkubationsdauer deutlich ab.

Eine absolute Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung wurde für die frisch präparierten Mikrosomen durch Zugabe von Heptadecansäure als internem Standard bei der Lipidextraktion durchgeführt:

Absolute Fettsäurezusammensetzung in den frisch präparierten Mikrosomen:

	16:0	18:0	18:1c	18:2	20:4	22:6
[nMol Fettsäure/mg Protein]	412	508	76	266	538	155

Da der absolute Gehalt an gesättigten Fettsäuren während der gesamten Inkubationsdauer als konstant angesehen werden kann (#66;#80;#95), ergaben sich für die Arachidonsäure und Docosahexaensäure über den Vergleich mit Stearinsäure folgende absolute Konzentrationen [nMol/mg Protein]:

	20:4	22:6
bei Versuchsbeginn	544	127
nach 12 Minuten	498	97
nach 30 Minuten	463	76
nach 60 Minuten	386	76

Bildung von Thiobarbitursäure-reaktivem Material ("Malonaldehyd"):

bei Versuchsbeginn	0,3 nMol/mg Protein
nach 12 Minuten	15,3 nMol/mg Protein
nach 30 Minuten	23,8 nMol/mg Protein
nach 60 Minuten	37,5 nMol/mg Protein

Bildung von Ethan und Pentan:

bei Versuchsbeginn	unterhalb der Nachweisgrenze
nach 10 Minuten	Ethan: 44 pMol/mg Protein
	Pentan: 54 pMol/mg Protein

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse des Experiments als Differenzen zu den Ausgangswerten zusammengefaßt. Innerhalb von 60 Minuten fiel der Cytochrom-P-450-Gehalt auf 50 Prozent ab, die Konzentrationen der Arachidonsäure und Docosahexaensäure sanken im selben Zeitraum auf 70 bzw. 60 Prozent des Anfangswertes. Zwischen 17 und 20 Prozent der Fettsäureverluste konnten dabei über die Thiobarbitursäure-Reaktion erfaßt werden. Die Pentanbildung machte etwa 1,2 Promille der Arachidonsäure-Abnahme, die Ethanbildung etwa 1,5 Promille der Docosahexaensäure-Abnahme aus.

Vergleichbare Ergebnisse sind auch in der Literatur veröffentlicht. So fanden verschiedene Autoren eine ähnliche Entwicklung bezüglich der Zerstörung von Cytochrom P-450 und der Abnahme polyungesättigter Fettsäuren, speziell der Arachidon- und Docosahexaensäure, bei der durch Eisenionen

Tabelle 9:

Zerstörung von Cytochrom P-450 und polyungesättigten Fettsäuren bei der durch Fe^{2+}/NADPH ausgelösten Lipidperoxidation (in nMol/mg Protein):

Zeit (min)	Abnahme von Cyt. P-450	Abnahme der ungesätt. Fettsäuren 20:4	/22:6	/Summe	Malonaldehydbildung	Bildung der Kohlenwasserstoffe Pentan / Ethan / Summe
12 min	-0,39	-46	-30	-76	+15	+0,054* +0,044* +0,098*
30 min	-0.52	-81	-51	-132	+24	
60 min	-0,61	-158	-51	-209	+37	

* gemessen nach 10 Minuten

und NADPH induzierten mikrosomalen Lipidperoxidation (#66;#80). May & McCay (#95) fanden zwischen den Fettsäureverlusten und der Bildung Thiobarbitursäure-reaktiven Materials ein molares Verhältnis von etwa 6 zu 1.

Vergleicht man die Abnahme des Cytochroms P-450 mit der Abnahme der polyungesättigten Fettsäuren, so ging die Zerstörung von einem Molekül Cytochrom P-450 mit dem Verlust von 200 bis 350 Molekülen an polyungesättigten Fettsäuren einher. Im Abschnitt 3.2.2. wurde gezeigt, daß zur Zerstörung eines Moleküls Cytochrom P-450 etwa 40 Moleküle eines Fettsäurehydroperoxids ausreichen. Da die Bildung von Fettsäurehydroperoxiden als erster Schritt der peroxidativen Zerstörung von polyungesättigten Fettsäuren angesehen wird (#167), dürfte nur ein kleiner Teil dieser intermediär gebildeten Fettsäurehydroperoxide für die Cytochrom-Zerstörung relevant geworden sein, der größere Teil zerfiel offenbar unter der Katalyse der zugesetzten Eisenionen.

3.3.2. Veränderungen der Phospholipidzusammensetzung durch mikrosomale Lipidperoxidation

25 ml einer Mikrosomensuspension mit 2 mg Protein pro ml wurden 100 Minuten mit Eisenionen in Gegenwart von NADPH inkubiert. Aus diesem Ansatz und einer gleichen Menge unbehandelter Mikrosomen wurden die Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch getrennt. Nachdem die Lipide durch Veraschen sichtbar gemacht wurden, konnten die in Abbildung 33 gezeigten Densitogramme erstellt werden. Die Identifizierung der einzelnen Lipidklassen erfolgte aus dem Vergleich mit den R_f-Werten entsprechender Referenzsubstanzen.

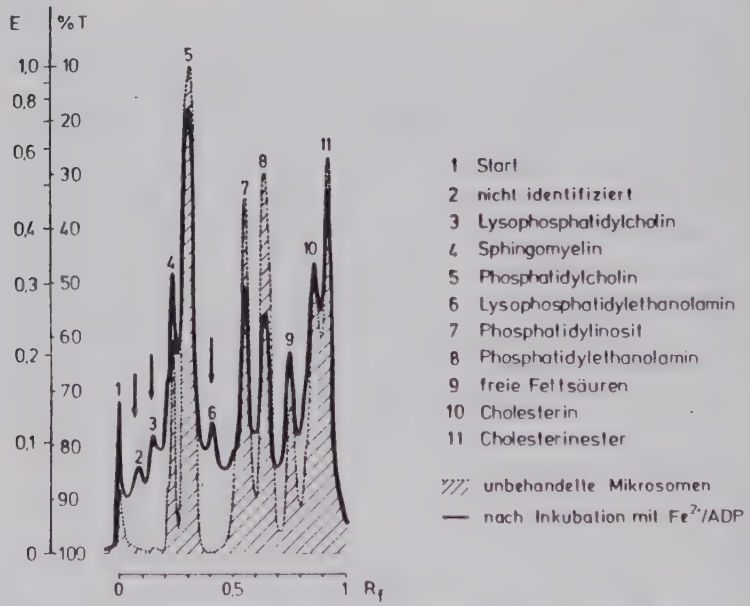


Abb. 33: Densitogramme der aus Mikrosomen extrahierten Lipide nach dünnschichtchromatographischer Trennung. Anfärbung durch Veraschung mit Kupferacetat-Reagenz

Wie aus der Abbildung hervorgeht, enthielt der Lipidextrakt aus unbehandelten Mikrosomen als Hauptbestandteile die Phospholipide Phosphatidylcholin (PC; Frakt. 5), Phosphatidylethanolamin (PE; Frakt. 8), Phosphatidylinosit (PI; Frakt. 7) und Sphingomyelin (SM; Frakt. 4), sowie Cholesterin (Ch; Frakt. 10), Cholesterin-Ester (Ch.E; Frakt. 11) und freie Fettsäuren

(frFS; Frakt. 9). Außerdem ließen sich Spuren von Lysophosphatidylcholin (LPC; Frakt. 3) erkennen; am Startpunkt (Frakt. 1) blieben offenbar stärker polare Verbindungen zurück, die jedoch nicht weiter charakterisiert wurden.

Im Dünnschichtchromatogramm des Lipidextrakts, der aus den peroxidierten Mikrosomen gewonnen wurde, tauchten zu den obengenannten Fraktionen neue Substanzpeaks auf, die in Abbildung 33 mit einem Pfeil markiert sind: Bei einem R_f-Wert von 0,09 (Frakt. 2) erschien eine Substanz, die nicht identifiziert werden konnte. Fraktion 3 (LPC) war wesentlich stärker vertreten als im Kontrollextrakt. Eine weitere Substanz ließ sich bei einem R_f-Wert von 0,42 (Frakt. 6) erkennen; den gleichen R_f-Wert hatte Lysophosphatidylethanolamin (LPE) als Referenzsubstanz. Stärker vertreten im Vergleich zur Kontrolle waren auch die freien Fettsäuren (Frakt. 9) und polare Verbindungen am Startpunkt (Frakt. 1). Die Erhöhung der Extinktion in Fraktion 4 (SM) scheint nicht durch Sphingomyelin selbst verursacht worden zu sein, sondern durch nicht abgetrennte Lipidverbindungen, die zu einer hohen Hintergrundfärbung in diesem Bereich führten. Dagegen waren die Fraktionen 5 (PC), 7 (PI), 8 (PE) und 11 (Ch.E.) im Vergleich zur Kontrolle schwächer vertreten, besonders auffallend war dies beim Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin.

3.3.3. Einfluß der Lipidperoxidation auf die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide

Zur Ermittlung der Fettsäurezusammensetzung der dünnschichtchromatographisch getrennten Lipidfraktionen wurde die Dünnschichtplatte nach der Chromatographie mit einem Glasschneider geteilt. Auf dem einen Plattenteil wurde die Lage der einzelnen Substanzflecken durch Veraschen mit Kupferacetat ermittelt, dementsprechend wurden auf dem unbehandelten Plattenteil Kieselgelzonen für die Fettsäure-Bestimmung ausgekratzt. Nach Zugabe von Heptadecansäure als internem Standard wurden diese Proben direkt umgeestert und die entstandenen Fettsäuremethylester gaschromatographisch bestimmt (siehe Abb. 34 bzw. Tab. 10).

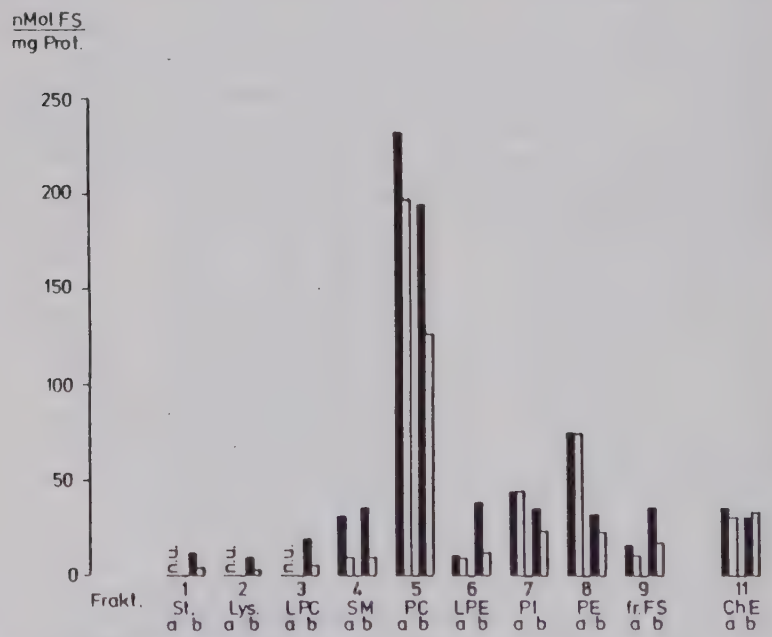


Abb. 34: Fettsäurezusammensetzung in Mikrosomen vor (a) bzw. nach (b) Peroxidation mit Fe^{2+}-ATP und NADPH
dunkle Balken: gesättigte Fettsäuren (16:0 und 18:0)
helle Balken: ungesättigte Fettsäuren (18:1, 18:2, 20:4 und 22:6)
n.u.: nicht untersucht

Tabelle 10:

Fettsäurezusammensetzung von dünnschichtchromatographisch getrennten Lipiden aus Lebermikrosomen vor bzw. nach Fe^{2+}/NADPH-induzierter Lipidperoxidation.

Analysierte Menge: Lipidextrakt aus der einem Milligramm Protein entsprechenden Mikrosomenmenge (Angaben in nMol pro Fraktion)

Kontrollmikrosomen:

	Fr.1 Start	Fr.2 (?)	Fr.3 LPC	Fr.4 SM	Fr.5 PC	Fr.6 LPE	Fr.7 PI	Fr.8 PE	Fr.9 frFS	Fr.11 Ch.E.
16:0	n.u.	n.u.	n.u.	15	122	2,6	12	43	11	30
18:0	"	"	"	15	108	7,4	31	31	4,6	4,6
18:1c	"	"	"	2,7	12	0,9	-	4,6	2,9	14
18:1t	"	"	"	0,7	9	0,2	-	3,1	0,8	1,8
18:2	"	"	"	0,6	69	0,7	6,3	18	3,6	15
20:4	"	"	"	2,5	92	6,2	38,0	40	2,7	-
22:6	"	"	"	2,1	14	1,3	-	8	-	-
Summe	"	"	"	39	426	19	87	148	26	65

Lipidextrakt nach Lipidperoxidation:

	Fr.1 Start	Fr.2 (?)	Fr.3 LPC	Fr.4 SM	Fr.5 PC	Fr.6 LPE	Fr.7 PI	Fr.8 PE	Fr.9 frFS	Fr.11 Ch.E.
16:0	6,0	5,3	9,3	19	105	16	13	19	25	26
18:0	5,2	4,1	9,9	16	88	20	22	13	10	4,4
18:1c	1,8	1,9	2,9	4,7	11	2,8	3,6	2,9	6,0	11
18:1t	0,5	0,5	1,0	1,2	10	1,1	0,6	1,4	1,9	2,1
18:2	0,8	0,4	0,9	1,4	62	2,8	4,0	7,8	6,8	16
20:4	0,4	0,2	0,4	-	42	3,7	15	10	1,8	3,4
22:6	-	-	-	1,6	-	0,4	-	0,8	-	-
Summe	15	12	24	44	318	48	58	55	52	63

prozentualer Anteil der gesättigten Fettsäuren (16:0 + 18:0):

Kontrolle:

Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.7	Fr.8	Fr.9	Fr.11
n.u.	n.u.	n.u.	77 %	54 %	53 %	49 %	50 %	60 %	53 %

nach Lipidperoxidation:

Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.7	Fr.8	Fr.9	Fr.11
75 %	78 %	80 %	80 %	61 %	77 %	60 %	58 %	67 %	48 %

n.u.: nicht untersucht
- : unterhalb der Nachweisgrenze

Aus der Summe der Fettsäuren pro Fraktion ergab sich die gleiche Tendenz wie bei der Densitometrie: Die Lipidperoxidation führte zu einer Abnahme der Fettsäuren in den Fraktionen 5 (Phosphatidylcholin), 7 (Phosphatidylinosit) und 8 (Phosphatidylethanolamin), die Abnahme in Fraktion 11 (Cholesterinester) war allerdings nur unwesentlich. In allen anderen Fraktionen (außer Fraktion 10; Cholesterin) stieg der Fettsäuregehalt an, der Anstieg betraf allerdings nur die gesättigten Fettsäuren. Betrachtet man den relativen Anteil der gesättigten Fettsäuren an der Summe aller gemessenen Fettsäuren (siehe unterer Teil der Tabelle), so ergaben sich für die Lipidfraktionen aus den unbehandelten Mikrosomen mit Ausnahme von Fraktion 4 (Sphingomyelin) Werte zwischen 50 und 60 Prozent (Sphingomyelin enthält längerkettige Fettsäuren, die nicht analysiert wurden). Nach der Lipidperoxidation waren diese Werte bei Fraktion 5 (Phosphatidylcholin), 7 (Phosphatidylinosit) und 8 (Phosphatidylethanolamin) nur leicht erhöht (58 - 61 Prozent), auffällig waren jedoch die hohen Anteile an gesättigten Fettsäuren in den Fraktionen 1 (Startmaterial), 2 (nicht identifizierte Substanz), 3 (Lysophosphatidylcholin) und 6 (Lysophosphatidylethanolamin).

Die beschriebenen Veränderungen im Phospholipidmuster und in der Fettsäurezusammensetzung der einzelnen Lipidklassen legen den Schluß nahe, daß aus den Diacylphosphatiden während der Inkubation peroxidierte polyungesättigte Fettsäuren abgespalten werden, was zur Bildung von Lysophosphatiden mit einem hohen Anteil gesättigter Fettsäuren führt. Die Bildung von polarem, lysophosphatidähnlichem Material und damit verbunden eine Abnahme von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin beschrieben auch May & McCay (#94) als Folge der mikrosomalen Lipidperoxidation; allerdings fanden die Autoren dabei nur eine geringe Abnahme des Ester-Wertes, bezogen auf den Phosphatgehalt der Phospholipide. Weitere Hinweise auf die Bildung von Lysophosphatidylcholin gibt es in der Arbeit von Tam & McCay (#167).

3.4. Mikrosomale Metabolisierung von Tetrachlormethan unter Stickstoff in Gegenwart von NADPH

Die NADPH-abhängige Metabolisierung von Tetrachlormethan in Mikrosomen wurde in einem geschlossenen System untersucht, in dem der Sauerstoff weitgehend durch Stickstoff ersetzt worden war. Die Restsauerstoffkonzentration konnte zum damaligen Zeitpunkt in Ermangelung einer ausreichend empfindlichen Sauerstoffelektrode nicht bestimmt werden; spätere Messungen im gleichen System ergaben, daß bei ausreichender Stickstoff-Spülung die Sauerstoffkonzentration auf 100 - 500 vpm gesenkt werden konnte und innerhalb von 60 Minuten maximal auf 1500 vpm (0,15 Prozent) anstieg.

3.4.1. Gleichgewichtseinstellung von Tri- und Tetrachlormethan im geschlossenen System

Die Bestimmung der Metabolisierung von Tetrachlormethan und der Bildung von Trichlormethan erfolgte durch Messung der Konzentrationen dieser Stoffe im Dampfraum (Headspace-Analyse). Dieses Verfahren hat zur Voraussetzung, daß sich das Gleichgewicht der chlorierten Kohlenwasserstoffe zwischen flüssiger und gasförmiger Phase mit einer ausreichenden Geschwindigkeit einstellt. Inwiefern diese Bedingung erfüllt war, ließ sich durch folgenden Versuch feststellen:

17 ml einer Mikrosomenlösung mit einem Proteingehalt von 2 mg/ml wurden anaerob im geschlossenen System inkubiert. 60 Minuten nach Zugabe von 5,64 µMol Tetrachlormethan wurde die Metabolisierung durch Zugabe von NADP gestartet, 20 Minuten später durch Zusatz von 0,2 ml einer 17-prozentigen Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) gestoppt, wodurch die Mikrosomen solubilisiert und die Enzyme inaktiviert werden. Vom Zeitpunkt der CCl_4-Zugabe an wurde die Konzentration der chlorierten Kohlenwasserstoffe über eine Dauer von vier Stunden in Abständen von ca. 10 Minuten gemessen; in Abbildung 35 sind die so erhaltenen Meßwerte gegen die Zeit aufgetragen.

Von der zugegebenen Menge an gasförmigem Tetrachlormethan wäre bei ausschließlicher Verteilung in der Gasphase eine Konzentration von 1158 vpm zu erwarten. Die Gleichgewichtseinstellung mit der flüssigen Phase war jedoch offensichtlich schon bei der ersten Gasprobenentnahme abgeschlossen, die acht Minuten nach der CCl_4-Zugabe erfolgte; eine Verteilungsphase war nach diesem Zeitpunkt nicht mehr feststellbar. Nach Zugabe der NADP-Lösung sank die CCl_4-Konzentration als Folge der Metabolisierung schnell ab,

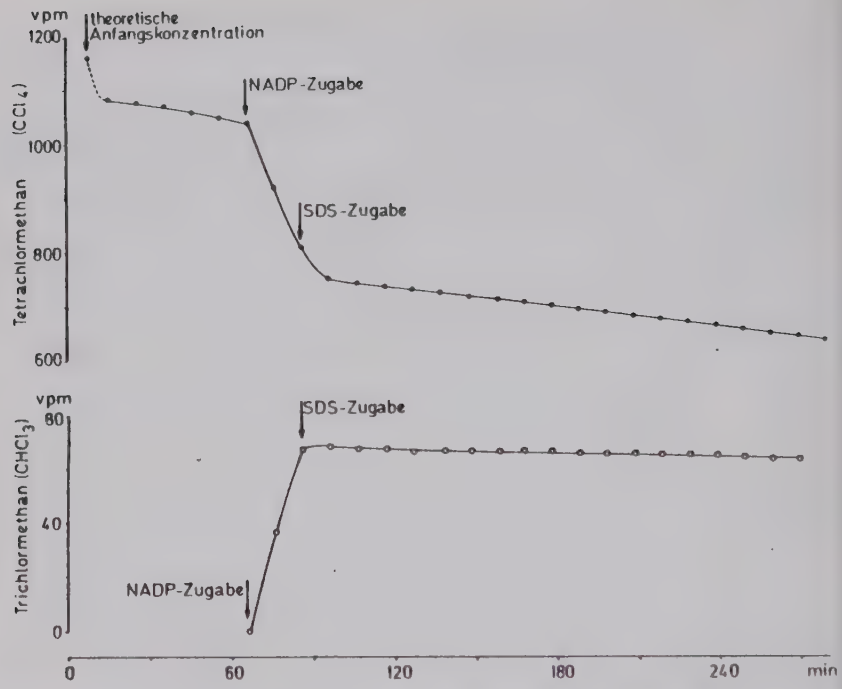


Abb. 35: Konzentrationsverlauf von Tetrachlormethan (oben) und Trichlormethan (unten) in der Gasphase bei anaerober Inkubation von Mikrosomen mit NADPH

allerdings war noch innerhalb von 10 Minuten nach der SDS-Zugabe eine weitere Konzentrationsabnahme feststellbar, die etwa 16 Prozent der durch die Metabolisierung verursachten Konzentrationsabnahme betrug. Die Gleichgewichtseinstellung hinkte demnach etwas hinter der Metabolisierung her. Die aus der Gasphase berechneten Werte für die CCl_4-Metabolisierung fallen daher in der Anfangsphase etwas zu niedrig aus. Dagegen war die Zunahme der $CHCl_3$-Konzentration nach Beendigung der Reaktion vernachlässigbar klein, d.h. die Gleichgewichtseinstellung zwischen flüssiger und gasförmiger Phase verlief beim Trichlormethan schneller.

In Abbildung 36 bzw. Tabelle 11 sind die aus den Konzentrationen in der Gasphase berechneten Werte für die CCl_4-Metabolisierung bzw. $CHCl_3$-Bildung aufgeführt. Aus den genannten Gründen erscheint die relative $CHCl_3$-Ausbeute bei den ersten zwei Messungen höher als nach der Gleichgewichtseinstellung.

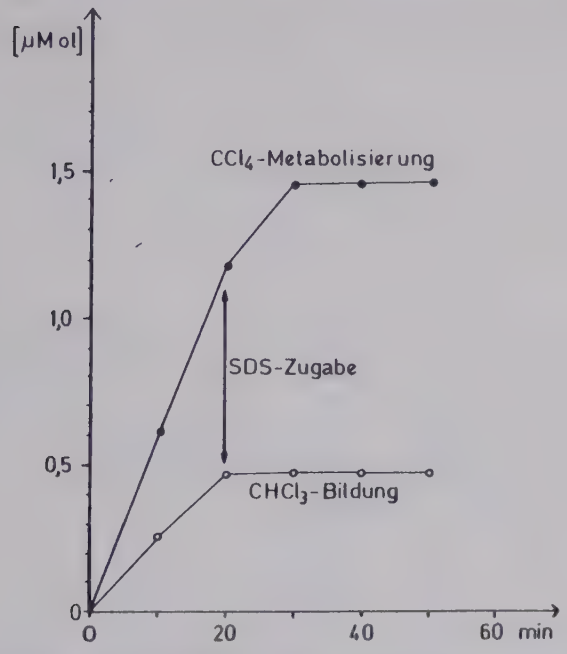


Abb. 36: Aus der Konzentration in der Gasphase berechneten Werte für die Metabolisierung von CCl_4 und Bildung von $CHCl_3$ unter anaeroben Bedingungen nach Zugabe von NADPH (0 min) und SDS (20 min)

Tabelle 11:

Anaerobe Metabolisierung von Tetrachlormethan

Zeit nach NADP-Zugabe	metabolisiertes Tetrachlormethan	gebildetes Trichlormethan	Verhältnis $CHCl_3$geb/CCl_4met
10,1 min	0,61 µMol	0,25 µMol	41 %
20,2 min (SDS)	1,18 µMol	0,47 µMol	39 %
30,4 min	1,45 µMol	0,48 µMol	33 %
40,9 min	1,46 µMol	0,48 µMol	33 %
51,0 min	1,46 µMol	0,48 µMol	33 %

3.4.2. Metabolisierung von Tetrachlormethan und Trichlormethan-Bildung

Die Metabolisierung von Tetrachlormethan und die Bildung von Trichlormethan unter Stickstoffatmosphäre wurden bei verschiedenen Anfangskonzentrationen im Bereich zwischen 530 bis 1440 vpm über einen Zeitraum von ca. einer Stunde gemessen. Die Meßergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

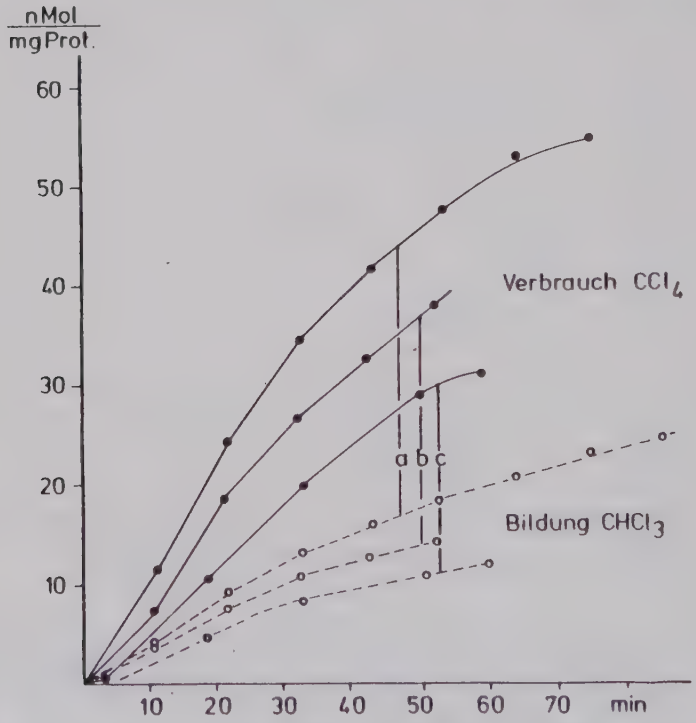


Abb. 37: Metabolisierung von CCl_4 und Bildung von $CHCl_3$ unter anaeroben Bedingungen. CCl_4-Anfangskonzentrationen:
a) 1440 vpm, b) 1040 vpm, c) 530 vpm

Die CCl_4-Verbrauchskurven zeigten einen S-förmigen Verlauf, d.h. die Metabolisierungsraten stiegen in den ersten 20 Minuten an und fielen danach langsam wieder ab. Der Anstieg dürfte durch die oben beschriebene verzögerte Gleichgewichtseinstellung verursacht worden sein, für das spätere Abfallen der Metabolisierungsraten sind mindestens zwei Faktoren verantwortlich:

- Wie aus dem Vergleich der Kurven hervorgeht, waren die Metabolisierungsraten deutlich von der CCl_4-Konzentration abhängig; die durch die Metabolisierung verursachte Abnahme der im System vorhandenen CCl_4-Menge führte folglich auch zu einer Abnahme der Metabolisierungsrate.
- Wie im Abschnitt 3.4.3. gezeigt wird, führte die Metabolisierung von Tetrachlormethan zu einer teilweisen Zerstörung des metabolisierenden Enzymsystems und damit zwangsläufig auch zu einer Abnahme der Metabolisierungsrate.

Die Bildungsgeschwindigkeit von Trichlormethan war in den ersten 30 Minuten konstant und fiel danach langsam ab. Aus den Meßwerten innerhalb der ersten 30 Minuten wurden die in Tabelle 12 gezeigten mittleren Metabolisierungs- bzw. Bildungsraten berechnet.

Tabelle 12:

Anaerobe Metabolisierung von Tetrachlormethan und Entstehung von Trichlormethan

Versuch Nr.	Anfangskonzentration von Tetrachlormethan im Gasraum	in Mikrosomen	CCl_4-Metabol. [nMol / min mg Prot]	$CHCl_3$-Bildung [nMol / min mg Prot]	Verhältnis $\frac{CHCl_3 geb.}{CCl_4 met.}$
1	530 vpm	22,6 µM	0,55	0,22	40 %
2	1040 vpm	33,6 µM	0,86	0,34	40 %
3	1440 vpm	46,6 µM	1,10	0,41	37 %
4	16700 vpm	700 µM	3,2*	1,28	(40 %)

*: aus der $CHCl_3$-Menge berechnet

Die Abhängigkeit der CCl_4-Metabolisierungs- bzw. $CHCl_3$-Bildungsraten von der CCl_4-Konzentration ist bei den Versuchen Nr. 1 bis 3 deutlich zu erkennen. Eine Erhöhung der CCl_4-Anfangskonzentration von 1440 vpm auf 16700 vpm (0,7 mM CCl_4) in Versuch Nr. 4 führte nur noch zu einer dreifachen Steigerung der $CHCl_3$-Bildungsrate. Demnach dürfte diese Konzentration bereits im Sättigungsbereich für das metabolisierende Enzymsystem liegen. Dies stimmt auch mit Untersuchungen von Masuda (#93) überein, der für die anaerobe CCl_4-Metabolisierung ein Maximum der $CHCl_3$-Bildung bei Konzentrationen zwischen 0,5 und 1,0 mM Tetrachlormethan fand.

Eine direkte Messung der CCl_4-Metabolisierungsrate war in diesem Konzentrationsbereich in unserem System nicht mehr möglich, da die stoffwechselbedingte CCl_4-Abnahme gegenüber der durch die Probenentnahme verursachten Konzentrationsänderung für eine exakte Bestimmung zu klein wurde. Wie jedoch aus den Versuchen Nr. 1 bis 3 hervorgeht, wird das Verhältnis zwischen der metabolisierten CCl_4-Menge und der gebildeten $CHCl_3$-Menge von der CCl_4-Konzentration nicht beeinflußt. Dies entspricht den Angaben in der Literatur, nach denen - unabhängig von der eingesetzten CCl_4-Menge - unter anaeroben Bedingungen zwischen 30 und 40 Prozent des metabolisierten Tetrachlormethans in Trichlormethan umgewandelt werden (#55;#93). Damit kann bei hohen CCl_4-Konzentrationen von der gebildeten $CHCl_3$-Menge auf die metabolisierte CCl_4-Menge geschlossen werden, womit sich für Versuch Nr. 4 eine mittlere Metabolisierungsrate von etwa drei nMol Tetrachlormethan pro Minute und Milligramm Protein ergibt.

Eine exakte Bestimmung der enzymkinetischen Daten V_{max} und K_m für die anaerobe CCl_4-Metabolisierung war über diese Versuche nicht möglich, da die initiale Metabolisierungsrate aus den oben genannten Gründen (verzögerte Gleichgewichtseinstellung von Tetrachlormethan, Abfall der Metabolisierungsrate durch Zerstörung des Enzyms und Abnahme der CCl_4-Konzentration) nicht mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden konnte.

3.4.3. Einfluß der Tetrachlormethan-Metabolisierung auf den Gehalt von Cytochrom P-450 und auf die Fettsäuren in Mikrosomen

In zwei Experimenten wurde der Einfluß der CCl_4-Metabolisierung auf den Gehalt an Cytochrom P-450 in den Mikrosomen untersucht und das Schicksal der polyungesättigten Fettsäuren durch Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung, der Bildung von Thiobarbitursäure-reaktivem Material und der Produktion von Ethan und Pentan verfolgt.

Im ersten Experiment wurden Mikrosomen 60 Minuten bei einer Anfangskonzentration von 530 vpm Tetrachlormethan im Gasraum mit NADPH anaerob inkubiert. Für die einzelnen Parameter wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Werte vor Beginn bzw. nach Ende des Versuchs ermittelt.

Tabelle 13:

Veränderungen in Mikrosomen bei anaerober CCl_4-Metabolisierung
Inkubation 60 Minuten anaerob, Anfangskonzentration 530 vpm CCl_4
(alle Angaben in nMol/mg Prot.)

	Cyt. P-450	MDA	Ethan	Pentan	(Summe)	CCl_4met.	$CHCl_4$geb.
0 min	1,15	0,82	0,001	0,002	0,003		
60 min	0,99	2,98	0,023	0,044	0,067		
Differenz	0,16	2,16	0,022	0,042	0,064	30,6	11,6

Fettsäurezusammensetzung (Mittelwert aus 3 Bestimmungen ± s.d.):

Fettsäure:	16:0	18:0	18:1c	18:2	20:4	22:6
0 min	406 ± 3	489 ± 5	59 ± 3	249 ± 3	494 ± 12	111 ± 2
60 min	397 ± 15	484 ± 9	61 ± 5	242 ± 3	476 ± 2	106 ± 7
Differenz	-9 ± 9	-5 ± 7	+2 ± 5	-7 ± 3	-18 ± 9	-5 ± 5

Da in diesem Experiment der Einfluß der CCl_4-Metabolisierung auf die Fettsäurezusammensetzung nur minimal war, wurde bei einem zweiten Versuch die CCl_4-Anfangskonzentration wesentlich erhöht (16700 vpm). Bei der 30-minütigen Inkubation wurden die in Tabelle 14 aufgeführten Werte ermittelt.

Tabelle 14:

Veränderungen in Mikrosomen bei anaerober CCl_4-Metabolisierung
Inkubation 30 Minuten anaerob, Anfangskonzentration 16 700 vpm CCl_4
(alle Angaben in nMol/mg Prot.)

	Cyt. P-450	MDA	Ethan	Pentan	(Summe)	CCl_4met.	$CHCl_4$geb.
0 min	1,24	0,32	0,000	0,000	0,000		
30 min	0,50	3,45	0,065	0,133	0,198		
Differenz	0,74	3,13	0,065	0,133	0,198	101*	38,3

*: aus $CHCl_3$-Bildung berechneter Wert

Fettsäurezusammensetzung (Mittelwert aus 3 Bestimmungen ± s.d.)

Fettsäure:	16:0	18:0	18:1c	18:1t	18:2	20:4	22:6
0 min	379 ± 8	491 ± 2	44 ± 1	17 ± 1	215 ± 1	535 ± 5	101 ± 1
30 min	389 ± 1	491 ± 10	52 ± 2	19 ± 2	212 ± 2	471 ± 19	67 ± 4
Differenz	+10 ± 7	0 ± 7	+8 ± 2	+2 ± 2	-3 ± 2	-64 ± 14	-34 ± 3

Während im zweiten Experiment die Konzentrationen der Arachidon- und Docosahexaensäure deutlich abfielen, waren die Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung beim ersten Versuch nur gering ausgeprägt und lagen im Bereich der Standardabweichung der Messung. In Tabelle 15 sind die Versuchsergebnisse der beiden Experimente zusammengefaßt.

Tabelle 15:
Veränderungen in Mikrosomen bei anaerober CCl_4-Metabolisierung
Vergleich der Experimente 1 und 2

	Experiment 1	Experiment 2	
Versuchsdauer	60 min	30 min	
CCl_4-Konzentration	530 vpm	16700 vpm	
	[nMol/mg Prot.]	[nMol/mg Prot.]	molares Verhältnis Exp. 1 : Exp. 2
CCl_4-Metabolisierung	30,6	101	1 : 3,3
$CHCl_3$-Bildung	11,6	38,3	1 : 3,3
Cyt. P-450 - Abnahme	0,16	0,74	1 : 4,6
Fettsäureabnahme			
Arachidonsäure (20:4)	18	64	1 : 3,6
Docosahexaensäure (22:6)	5	34	1 : 6,8
Summe 20:4 + 22:6	23	98	1 : 4,3
"Malonaldehyd-Bildung"	2,16	3,13	1 : 1,4
Kohlenwasserstoff-Bildung			
Pentan	0,042	0,133	1 : 3,2
Ethan	0,022	0,065	1 : 3,0
Summe Pentan + Ethan	0,064	0,198	1 : 3,1

Verglichen mit Experiment 1 wurde beim zweiten Experiment etwa dreimal mehr Trichlormethan gebildet und damit auch entsprechend mehr Tetrachlormethan metabolisiert. Um den gleichen Faktor war die Bildung von Pentan und Ethan erhöht. Die gleiche Tendenz ist bezüglich der Zerstörung der polyungesättigten Fettsäuren zu erkennen; die relativ kleinen Fettsäuredifferenzen im Experiment 1, speziell bei der Docosahexaensäure, konnten jedoch nicht zuverlässig bestimmt werden. Die Zerstörung von Cytochrom P-450 war im zweiten Experiment ebenfalls wesentlich stärker ausgeprägt (Faktor 4,6). Dagegen war die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Produkte

nur um den Faktor 1,4 erhöht.

Die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen in diesen Versuchen zeigt, daß offensichtlich auch durch gründliche Spülung des Inkubationssystems mit hochgereinigtem Stickstoff keine vollständige Entfernung von Sauerstoff erreicht werden konnte. Bezogen auf die Zerstörung der polyungesättigten Fettsäuren betrug die Bildung Thiobarbitursäure-reaktiven Materials jedoch nur noch 3 Mol-Prozent (Experiment 2) gegenüber 20 Mol-Prozent bei der durch Fe^{2+}/NADPH ausgelösten Lipidperoxidation (siehe 3.3.1.). Der beobachtete Verlust polyungesättigter Fettsäuren bei der CCl_4-Metabolisierung in diesen Versuchen kann daher nur zu einem kleinen Teil durch peroxidative Prozesse hervorgerufen worden sein. Für das molare Verhältnis zwischen metabolisiertem Tetrachlormethan und der Abnahme polyungesättigter Fettsäuren ergibt sich ein Wert von nahezu eins; die Fettsäurezerstörung ist demnach eng mit der CCl_4-Metabolisierung gekoppelt.

Auch bei der Metabolisierung von Tetrachlormethan unter nahezu anaeroben Bedingungen wurde die Bildung der Kohlenwasserstoffe Pentan und Ethan beobachtet; trotz der vergleichsweise geringen Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Produkte lagen die relativen Mengen der Kohlenwasserstoffe, bezogen auf die Abnahmen der Arachidon- bzw. Docosahexaensäure, sogar über den Werten, die unter aeroben Bedingungen bei der peroxidativen Zerstörung polyungesättigter Fettsäuren in Gegenwart von Eisenionen und NADPH gefunden wurden (vergleiche 3.3.1.).

Frank et al. (#51) zeigten, daß Ethan und Pentan unter aeroben Bedingungen durch Rattenlebermikrosomen oxidativ metabolisiert werden. Wurde die Metabolisierung der Kohlenwasserstoffe, die bei der Inkubation mit Eisenionen und NADPH entstanden, durch Kohlenmonoxid gehemmt, so erhöhte sich ihre Konzentration im Inkubationssystem um das drei- bis vierfache. Da unter anaeroben Bedingungen die oxidative Kohlenwasserstoff-Metabolisierung nicht ablaufen kann, könnte eventuell schon ein kleiner Anteil oxidativ zerstörter Fettsäuren für die relativ hohe Kohlenwasserstoff-Bildung bei der anaeroben CCl_4-Metabolisierung verantwortlich sein. Da die Pentan- und Ethan-Entwicklung aber weit besser mit der CCl_4-Metabolisierung als mit der Bildung Thiobarbitursäure-reaktiver Produkte korrelierte (vergleiche Experiment 1 mit Experiment 2), erscheint es wahrscheinlicher, daß diese Kohlenwasserstoffe durch eine direkte Reaktion von CCl_4-Metaboliten mit den polyungesättigten Fettsäuren entstanden waren als durch peroxidative Zersetzungsprozesse.

Quantitativ stellt die Bildung von Kohlenwasserstoffen eine unbedeutende Nebenreaktion bei der Zerstörung ungesättigter Fettsäuren dar und läßt daher nur wenig Aussagen über den Mechanismus der Fettsäurezerstörung zu. Bei der Addition von CCl_3-Radikalen an Fettsäuredoppelbindungen, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurde (siehe 3.5.5.), ist eine Abspaltung von Alkylradikalen mit anschließender Bildung von Pentan und Ethan (siehe Abbildung 38) mechanistisch genau so plausibel wie bei dem in Abbildung 4 (siehe Seite 10) dargestellten Mechanismus, der für die Kohlenwasserstoff-Bildung aus peroxidierten Fettsäuren postuliert wird. Die Bildung von Ethan und Pentan wäre demnach nicht mehr als Beweis für eine Lipidperoxidation, sondern allgemeiner als Hinweis für radikalische Prozesse bei der Fettsäurezerstörung anzusehen.

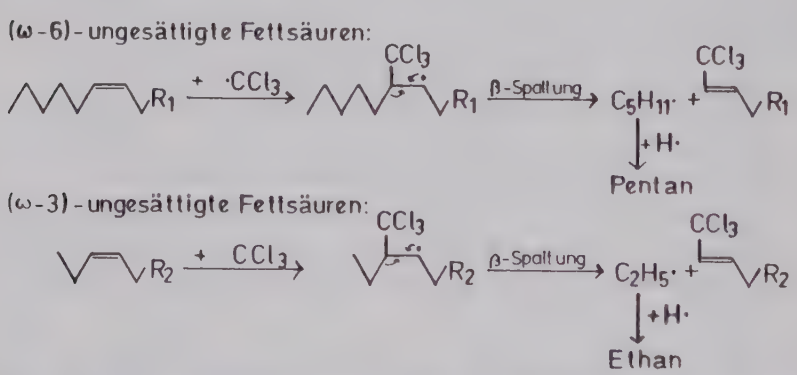


Abb. 38: möglicher Mechanismus der Ethan- und Pentanentstehung aus ungesättigten Fettsäuren bei anaerober Metabolisierung von CCl_4. Arachidonsäure: $R_1 = C_{12}O_2H_{17}$; Docosahexaensäure: $R_2 = C_{17}O_2H_{23}$

Mit der CCl_4-Metabolisierung unter weitgehendem Sauerstoffausschluß war eine deutliche Abnahme des Cytochrom P-450-Gehalts in den Mikrosomen verbunden, was sich auch im allmählichen Abfallen der Metabolisierungsraten widerspiegelte. Die Möglichkeit, daß dieses Cytochrom auch unter anaeroben Bedingungen, also ohne die Beteiligung von Fettsäurehydroperoxiden, als Folge der CCl_4-Metabolisierung geschädigt wird, ist inzwischen zweifelsfrei nachgewiesen (#31;#93;#199). Daß dafür eine direkte Reaktion der gebildeten CCl_3-Radikale mit dem Cytochrom verantwortlich ist, liegt auf der Hand und wird von Untersuchungen von Fernandez et al. (#43) und Frank et al. (#52) unterstützt, die eine bevorzugte irreversible Proteinbindung

von $^{14}CCl_4$-Metaboliten an dieses Cytochrom feststellten. Vergleicht man die metabolisierte CCl_4-Menge in unseren Experimenten mit der Abnahme des Cytochroms, so dürfte der Umsatz von ca. 140 bis 190 Molekülen Tetrachlormethan zur Zerstörung eines Moleküls Cytochrom P-450 führen.

3.5. Kovalente Bindung von radioaktiv markierten Tetrachlormethan-Metaboliten an mikrosomale Lipide

3.5.1. Inkubation von Mikrosomen mit radioaktivem Tetrachlormethan unter Stickstoff

Für die Gewinnung von mikrosomalen Lipiden, die durch CCl_4-Metaboliten kovalent modifiziert sein sollten, wurden Lebermikrosomen unter weitgehendem Ausschluß von Sauerstoff mit $[^{14}C]$-Tetrachlormethan inkubiert. Um ein möglichst hohes Ausmaß der kovalenten Bindung zu erreichen, wurden für den Versuch Mikrosomen von Phenobarbital-behandelten Ratten verwendet; die Cytochrom P-450-Konzentration in den Mikrosomen war dadurch auf 1,78 nMol/mg Protein erhöht. $[^{14}C]$-Tetrachlormethan wurde in hoher Konzentration eingesetzt (insgesamt 11 µMol bei einem Gesamtvolumen des Inkubationssystems von 15 ml), um möglichst im Sättigungsbereich der CCl_4-Metabolisierung zu arbeiten. Nach 60 Minuten Inkubation wurden die flüchtigen Metaboliten und nicht umgesetztes Tetrachlormethan in einer Kühlfalle kondensiert. Die Lipide wurden mit Trichlormethan/Methanol extrahiert, ausgefallenes Protein abfiltriert und restliches polares Material an Sephadex gebunden. Anschließend wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeengt und in reinem Trichlormethan aufgenommen.

Aus der Bestimmung der Radioaktivität bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten ergab sich folgende Bilanz:

Tabelle 16:
Anaerobe Metabolisierung von $[^{14}C]$-Tetrachlormethan
Bilanzierung der Radioaktivität

Eingesetzte Radioaktivität 11 µMol $^{14}CCl_4$ (1,82 Ci/Mol)	20,0 µCi	100,0 %
nicht umgesetztes $^{14}CCl_4$ und flüchtige Metaboliten in der Kühlfalle	12,8 µCi	64,0 %
ausgefälltes Protein	0,72 µCi	3,5 %
an Sephadex adsorbiertes Material	0,15 µCi	0,7 %
zurückgewonnenes Destillat beim Einengen am Rotationsverdampfer	0,80 µCi	4,0 %
Lipidextrakt in Trichlormethan gelöst	3,17 µCi	15,9 %
bilanzierte Radioaktivität	17,6 µCi	88,2 %
Verluste	2,4 µCi	11,8 %

Die Verluste traten in erster Linie beim Einengen des Trichlormethan-Methanol-Extrakts am Rotationsverdampfer auf. Obwohl das Inkubationsmedium nach der Reaktion so lange mit Stickstoff gespült worden war, bis in der Kühlfalle kein weiteres radioaktives Material mehr kondensiert werden konnte, waren im Trichlormethan-Methanol-Extrakt offensichtlich radioaktive Verbindungen vorhanden, die erst unter Wasserstrahlvakuum abdestilliert wurden.

Wegen der Gefahr einer radioaktiven Kontamination wurde bei dem Versuch auf die gaschromatographische Bestimmung von Tri- und Tetrachlormethan verzichtet. Die ungefähre Menge an metabolisiertem Tetrachlormethan läßt sich jedoch abschätzen, wenn außer Trichlormethan keine nennenswerten Mengen an anderen flüchtigen CCl_4-Metaboliten entstanden waren. In diesem Fall sollten bei vollständiger Metabolisierung des eingesetzten Tetrachlormethans durch die $CHCl_3$-Bildung noch etwa 35 Prozent der Gesamtradioaktivität in Form leicht flüchtiger Verbindungen vorliegen. Nach der in Tab. 16 aufgestellten Bilanz lagen bei Versuchsende mindestens 68 Prozent (flüchtiges Material in der Kühlfalle und im Rotationsverdampfer), unter Hinzurechnung der Verluste höchstens 80 Prozent der eingesetzten Radioaktivität in Form flüchtiger Verbindungen vor; demnach muß zwischen einem Drittel und der Hälfte des vorgelegten Tetrachlormethans metabolisiert worden sein. Die kovalent an Lipide gebundene Radioaktivität beträgt damit zwischen 30 und 50 Prozent des umgesetzten Tetrachlormethans. Ähnliche Werte (40 bis 45 Prozent) wurden von Glende et al. (#55) für die kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten an Lipide gefunden.

Die für den Versuch eingesetzte Mikrosomensuspension enthielt insgesamt 30 mg mikrosomales Protein. Pro mg Protein wurden 0,106 µCi an die extrahierten Lipide gebunden; bei einer spezifischen Aktivität von 1,82 Ci/Mol des eingesetzten Tetrachlormethan entspricht dies 58 nMol kovalent an Lipide gebundener CCl_4-Metaboliten pro mg Protein.

3.5.2. Phospholipidzusammensetzung des Lipidextrakts

Die einzelnen Phospholipidklassen des Lipidextrakts konnten durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Platten getrennt werden (siehe Abbildung 39).

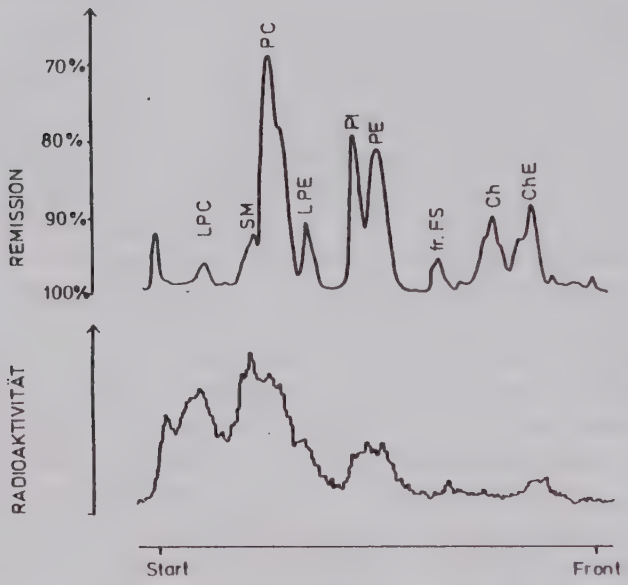


Abb. 39: Dünnschichtchromatographische Trennung von mikrosomalen Lipiden nach anaerober Metabolisierung von $^{14}CCl_4$;
Radioaktivität der Probe ca. 6 nCi
oben: Densitogramm bei 600 nm (verascht mit Kupferacetat-Reagenz)
unten: Radioaktivitätsscan

Zur Isolierung einer größeren Menge an Phospholipiden wurde ein Drittel des gesamten Lipidextrakts (ca. 1 µCi) über die gesamte Breite (16 cm) der Kieselgelplatte aufgetragen und nach der dünnschichtchromatographischen Trennung aus den ausgekratzten Kieselgelzonen eluiert. Aus aliquoten Anteilen der einzelnen Eluate wurde die Radioaktivität und der Phosphatgehalt ermittelt (siehe Tabelle 17). Die lipidgebundene Radioaktivität war demnach hauptsächlich in den Phospholipiden lokalisiert, wobei der größte Anteil auf Phosphatidylcholin entfiel. Ähnliche Verteilungsmuster für die kovalente Lipidbindung fanden auch Uhleke & Werner (#176) bzw. Villarruel et

al. (#182) bei der anaeroben CCl_4-Metabolisierung. Relativ zum Phosphatgehalt (spezifische Bindung) war die kovalente Bindung in den drei Hauptklassen der mikrosomalen Phospholipide - Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinosit - deutlich geringer ausgeprägt als in den übrigen Phosphat-haltigen Fraktionen.

Tabelle 17 :

Kovalente Bindung und Phosphatgehalt dünnschichtchromatographisch getrennter Phospholipide nach anaerober Metabolisierung von $^{14}CCl_4$

Zone	Aktivität (nCi)	kovalente Bindung (nMol)	Phosphat-gehalt (nMol)	spezifische Bindung *)
1 (Start)	93	51	136	38 %
2 (LPC)	30	16	38	43 %
3 (SM)	89	49	262	19 %
4 (PC)	199	109	3160	3,4 %
5 (PS/LPE)	65	36	235	15 %
6 (PI)	45	25	759	3,3 %
7 (PE)	37	20	692	2,9 %
8 (frFS,Ch)	58	32	-	-
Summe	615	338	5280	6,4 %
Auftragslösung (bezogen auf 1 µCi):				
	1000	554	9640	5,7 %
Wiederfindung nach Dünnschichtchromatographie und Elution:				
		62 %	55 %	

*) Mol-Prozent kovalente Bindung bezogen auf Mol Phosphat

LPC: Lysophosphatidylcholin; SM: Sphingomyelin; PC: Phosphatidylcholin; PS: Phosphatidylserin; LPE: Lysophosphatidylethanolamin; PI: Phosphatidylinosit; PE: Phosphatidylethanolamin; frFS,Ch: freie Fettsäuren, Cholesterin und Cholesterinester.

3.5.3. Synthese der Fettsäuremethylester aus dem Lipidextrakt

Zur Synthese von Fettsäuremethylestern wurde ein Teil der Lipide, die nach der anaeroben Metabolisierung von [^{14}C]-Tetrachlormethan extrahiert worden waren, mit einer Lösung von 14 Prozent Bortrifluorid in Methanol umgeestert. Nach Zugabe von einem Volumenteil Wasser wurden die entstandenen Methylester mit n-Hexan aus der Methanol-Wasser-Phase extrahiert, wobei die lipidgebundene Radioaktivität nahezu vollständig in die Hexanphase überging (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18:
Extraktion radioaktiver Produkte nach Umesterung mit Methanol

	Radioaktivität	kov. Bindung
Zur Umesterung eingesetzter Lipidextrakt	1,46 µCi	802 nMol (100 %)
Hexanextrakt nach Umesterung mit Methanol	1,43 µCi	786 nMol (98 %)
Rückstand in Methanol-Wasser-Phase	0,032 µCi	18 nMol (2 %)

Die gute Hexanlöslichkeit der radioaktiv markierten Produkte spricht dafür, daß die kovalente Bindung der CCl_4-Metaboliten an apolare Strukturbestandteile, d.h. offensichtlich an die Fettsäurereste der Phospholipide erfolgt war.

3.5.4. Chromatographische Analyse des Fettsäuremethylester-Extrakts

3.5.4.1. Dünnschichtchromatographische Trennung

Der Hexanextrakt der umgeesterten Lipide ließ sich durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Fließmittel n-Hexan/Diethylether/Essigsäure, 80:20:1,5; v/v) in fünf verschiedene Fraktionen mit radioaktivem Material trennen (siehe Abbildung 40).

Zur quantitativen Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wurden aus drei Dünnschichtplatten, auf denen jeweils 15 µl des Hexanextrakts aufgetrennt wurden, das Kieselgelmaterial der einzelnen Zonen ausgekratzt, die Substanzen daraus mit Methanol eluiert und nach Entfernung des Lösungsmittels der Scintillationszählung zugeführt (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19:

Dünnschichtchromatographische Trennung des Hexanextrakts

	Radioaktivität (MW ± s.d.)	prozentualer Anteil (Wiederfindung)
Auftragslösung	13,9 nCi	100,0 %
Fr. 1 (Start)	0,41 ± 0,05 nCi	3,0 %
Fr. 2 (R_f 0,12)	1,68 ± 0,22 nCi	12,1 %
Fr. 3 (R_f 0,23)	2,41 ± 0,11 nCi	17,4 %
Fr. 4 (R_f 0,38)	3,01 ± 0,11 nCi	21,7 %
Fr. 5 (R_f 0,55; FSME)	5,65 ± 0,49 nCi	40,6 %
Summe (Fr. 1 - 5)	13,2 ± 0,6 nCi	94,7 %

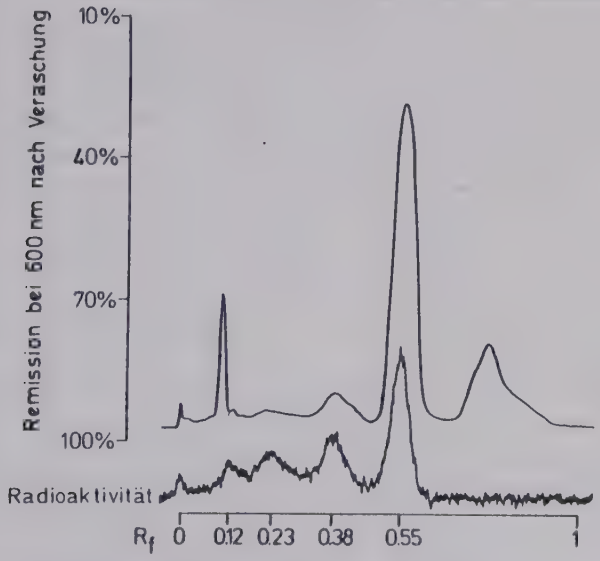


Abb. 40: Dünnschichtchromatographische Trennung der umgeesterten Lipide (Hexanextrakt) aus Mikrosomen nach anaerober Metabolisierung von $^{14}CCl_4$; aufgetragene Menge: 15 µl (13,9 nCi)
oben: Densitogramm nach Veraschen mit Kupferacetat-Reagenz
unten: Radioaktivitätsscan

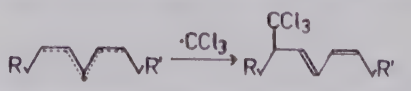
Fraktion 5, im Densitogramm die größte Fraktion, enthielt knapp die Hälfte der radioaktiv markierten Produkte. Offensichtlich handelt es sich

dabei um modifizierte Fettsäuremethylester, da auch die "normalen" Fettsäuremethylester in dieser Fraktion lokalisiert waren.

Nach der densitometrischen Auswertung zu urteilen war die Substanzmenge in den übrigen Fraktionen (Fr. 1 - 4) wesentlich geringer. Da jedoch etwa die Hälfte der Radioaktivität auf diese Fraktionen entfällt, dürfte bei ihnen der relative Anteil kovalent modifizierter Substanzen höher sein als in Fraktion 5.

Benedetti et al. (#12;#13) führten zum Teil ähnliche Untersuchungen zur Charakterisierung der kovalenten Lipidbindung von CCl_4-Metaboliten in vivo und in vitro durch. Nach Umesterung der mikrosomalen Lipide, die sie aus den Lebern von $[^{14}C]$-Tetrachlormethan-behandelten Ratten isoliert hatten, mit Methanol fanden sie im Hexanextrakt bei der dünnschichtchromatographischen Trennung eine ähnliche Verteilung der Radioaktivität auf fünf Fraktionen wie wir. 42 Prozent der Radioaktivität war in der Fettsäuremethylester-Fraktion enthalten, 28 Prozent in einer Fraktion mit einem kleineren R_f-Wert, die offensichtlich der Fraktion 4 in unseren Experimenten entspricht und von ihnen als Fraktion "D" bezeichnet wurde. Bei der gaschromatographischen Analyse der Fettsäuremethylester-Fraktion unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors (ECD) konnten sie die gleichen chlorhaltigen Produkte nachweisen wie im ungetrennten Hexanextrakt; da diese Fraktion keine erhöhte Dienkonjugation aufwies, nahmen sie an, daß es sich bei diesen Produkten um Trichlormethyl-Additionsverbindungen an Fettsäuredoppelbindungen handelte.

Im Gegensatz dazu fanden sie in der Fraktion "D" eine starke Dienkonjugation, bei der Gaschromatographie wurden hier jedoch keine ECD-positiven Substanzen eluiert, was sie auf die erhöhte Polarität dieser Produkte zurückführten. Nach ihrer Analyse enthielten diese Produkte pro Fettsäuremethylester einen Trichlormethylrest und ein konjugiertes Dien, weshalb sie für die Struktur dieser Verbindungen Produkte aus Terminationsreaktionen zwischen Fettsäuremethylester-Radikalen und Trichlormethyl-Radikalen annahmen:



Eine solche Struktur kann aber die erhöhte gaschromatographische Immobilität dieser Produkte im Vergleich zu den Trichlormethyl-Additionsprodukten in der Fettsäuremethylesterfraktion nicht erklären.

3.5.4.2. Trennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Um die Fettsäuremethylester bzw. ihre kovalent modifizierten Derivate für weitere Untersuchungen aufzutrennen, wurde die Hochdruckflüssigkeitschromatographie unter Verwendung einer RP-18-Säule angewandt (siehe 2.5.3.2.2.).

Die Trenncharakteristik dieses Systems geht aus Abbildung 17 (Seite 62) hervor: Mit zunehmender Kettenlänge nehmen die Retentionsvolumina für die einzelnen Fettsäuremethylester zu (vergleiche 16:0-ME/17:0-ME/18:0-ME), Doppelbindungen haben den gegenteiligen Effekt (vergleiche 18:0-ME/18:1-ME/18:2-ME/18:3-ME). Weiterhin ist ersichtlich, daß die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Fettsäuremethylester bei 206 nm sehr stark von der Anzahl der Doppelbindungen im Molekül abhängig sind, weshalb eine quantitative Analyse auf der Grundlage der UV-Extinktion nicht sinnvoll erscheint.

Zur präparativen Trennung wurde ein Teil des Hexanextrakts mit einem Radioaktivitätsgehalt von ca. 390 nCi auf 20 µl eingeengt und chromatographiert. Das Eluat der Säule wurde nach Registrierung der Extinktion bei 206 nm in 1-ml-Fraktionen gesammelt und aus einem Aliquot (20 µl) jeder Fraktion die Radioaktivität bestimmt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 41 dargestellt.

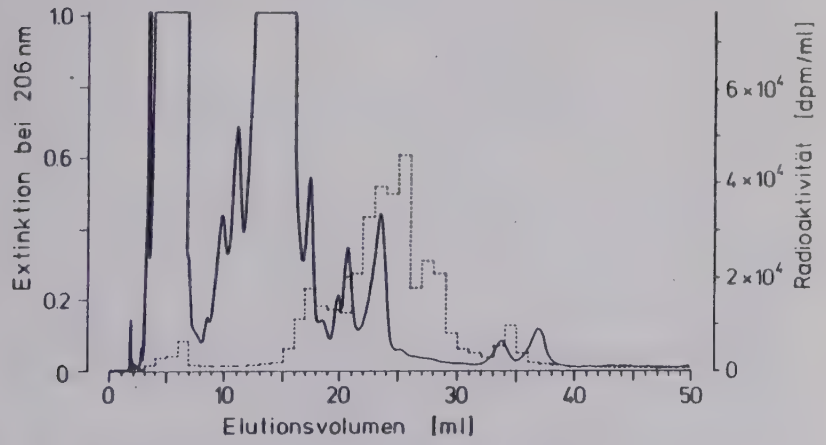


Abb. 41: HPLC-Trennung der umgeesterten Lipide (Hexanextrakt) aus Mikrosomen nach anaerober Metabolisierung von $^{14}CCl_4$
durchgezogene Linie: Extinktion des Eluats bei 206 nm
gestrichelte Linie: Radioaktivität im Eluat (1ml-Fraktionen)
Probenmenge: 20 µl des konzentrierten Hexanextrakts (ca. 390 nCi)

Gaschromatographisch konnten folgende Substanzen in den einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden:

Fr. 5- 7: 2,6-Di-t-butyl-p-cresol (BHT)

Fr. 13-14: Docosahexaensäuremethylester (22:6-ME)

Fr. 14-15: Arachidonsäuremethylester (20:4-ME)

Fr. 15-16: Linolsäuremethylester (18:2-ME),
in geringen Mengen Docosapentaensäuremethylester (22:5-ME)

Fr. 21-22: Palmitinsäuremethylester (16:0-ME) und
Ölsäuremethylester (18:1-ME)

Fr. 24: Weichmacher (Phthalsäureester, identifiziert durch GC/MS)

Fr. 27: in geringen Mengen Heptadecansäuremethylester (17:0-ME)

Fr. 33-35: Stearinsäuremethylester (18:0-ME)

Fr. 37-38: Weichmacher

Die ersten 50 ml des Eluats (Fr. 1 - 50) enthielten insgesamt 173 nCi radioaktives Material, was etwa 44 Prozent der eingesetzten Menge entsprach. In den Fraktionen 1 bis 8, die keine Fettsäuremethylester enthielten, wurden 7 nCi des radioaktiven Materials eluiert, der Rest verteilte sich im wesentlichen auf die Fraktionen 16 bis 36. Eine Zuordnung des Elutionsprofils der Radioaktivität zu entsprechenden Peaks im Chromatogramm der UV-Detektion war nicht möglich.

Das auf der Trennsäule zurückbleibende radioaktive Material wurde bei der weiteren Chromatographie mit Methanol/Wasser nur sehr langsam eluiert. Erst durch Spülen mit einem n-Hexan/Isopropanol-Gemisch konnte die Säule vollständig dekontaminiert werden.

Eine quantitative Bestimmung der Wiederfindung der Radioaktivität wurde mit einer Probe des Hexanextrakts durchgeführt, die 28 nCi markiertes Material enthielt (Injektionsvolumen 30 µl). Zunächst wurde mit 45 ml Methanol/Wasser-Gemisch (92:8, v/v) chromatographiert, dann wurde als mobile Phase n-Hexan/Isopropanol (2:1, v/v) verwendet. Aus der Messung der Radioaktivität im Eluat (Fraktionsgröße 3 ml) wurde ein Elutionsprofil erstellt, das in Abbildung 42 wiedergegeben ist.

Das n-Hexan/Isopropanol-Gemisch erschien ab Fraktion 17 im Eluat. In der anschließenden Fraktion waren 14,3 nCi des markierten Materials enthalten, was 50,8 Prozent der eingesetzten Aktivität entspricht. Aufgrund des Elutionsverhaltens sollte es sich bei den Substanzen in dieser Fraktion um stark lipophile Verbindungen handeln. Insgesamt ergab sich folgende Bilanz (Tabelle 20):

Tabelle 20:

Radioaktivitätsbilanz bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Zur Trennung eingesetzte Menge:	28,1 nCi	(100,0 %)
mit Methanol/Wasser (92:8, v/v) eluierte Aktivität: (Fr. 1 - 16)	12,1 nCi	(43,2 %)
mit n-Hexan/Isopropanol (2:1, v/v) eluierte Aktivität: (Fr. 17 - 34)	14,5 nCi	(51,7 %)
Wiederfindung (Fr. 1 - 34):	26,6 nCi	(94,9 %)

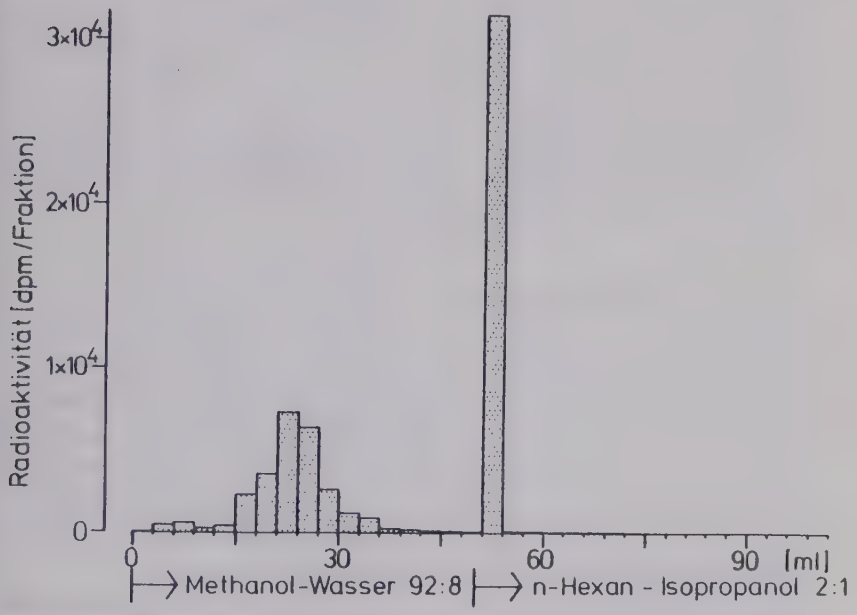


Abb. 42: Elutionsprofil der Radioaktivität bei der HPLC-Trennung umgeesterter Lipide (Hexanextrakt) aus Mikrosomen nach anaerober Metabolisierung von $^{14}CCl_4$.
Fraktionen à 3 ml; Wechsel des Elutionsmittels bei Fraktion 17;
Probenmenge: 30 µl des Hexanextrakts (28 nCi)

3.5.4.3. Gaschromatographische Trennung

3.5.4.3.1. Detektion mit dem Flammenionisationsdetektor (FID)

Unter Verwendung des FID für den Substanznachweis konnte die relative Zusammensetzung der nicht modifizierten Fettsäuremethylester im Hexanextrakt ermittelt werden:

Fettsäure:	16:0	18:0	18:1c	18:1t	18:2	20:4	22:5	22:6	Summe
Mol-%	19,7	27,1	2,9	1,3	15,0	28,6	0,9	4,5	100

Im Bezug auf die im Hexanextrakt enthaltene Radioaktivität ergab sich dabei ein Verhältnis von 40 Mol der Fettsäuremethylester zu einem Mol kovalent gebundener CCl_4-Metaboliten. Die aufgeführten Fettsäuremethylester konnten auch in den entsprechenden Fraktionen der HPLC-Trennung gaschromatographisch nachgewiesen werden (siehe 3.5.4.2.). Die Detektion mit dem Flammenionisationsdetektor brachte jedoch keinen Aufschluß über die kovalent modifizierten Lipide, weder im Hexanextrakt selbst noch in den einzelnen durch HPLC getrennten Fraktionen.

3.5.4.3.2. Detektion mit dem Elektroneneinfangdetektor (ECD)

Als stark selektive und zudem sehr empfindliche Methode zum Nachweis halogenierter Verbindungen erwies sich die Kapillar-Gaschromatographie unter Verwendung eines Elektroneneinfangdetektors (siehe 2.5.3.2.4.). Damit ließen sich im Hexanextrakt eine Reihe ECD-empfindlicher Verbindungen nachweisen, die mit dem Flammenionisationsdetektor nicht erfaßt werden konnten. In Abbildung 43 sind die Gaschromatogramme gleicher Mengen des Hexanextrakts unter Verwendung eines ECD (a) bzw. eines FID (b) bei ansonsten identischen gaschromatographischen Bedingungen dargestellt.

Bei den im ECD-Chromatogramm bis zu einer Retentionszeit von zehn Minuten auftretenden Peaks handelte es sich zum größten Teil um Verunreinigungen aus dem Lösungsmittel. Spezifisch waren dagegen die Peaks der weniger flüchtigen Verbindungen mit einer Retentionzeit von mehr als 15 Minuten. Sie konnten auch in den Fraktionen der HPLC-Trennung, die größere Mengen an radioaktivem Material enthielten, nachgewiesen werden, wobei in den einzelnen Fraktionen jeweils unterschiedliche Peakmuster auftraten. Als Beispiel sind in Abbildung 44 die ECD-Chromatogramme einiger Fraktionen gezeigt.

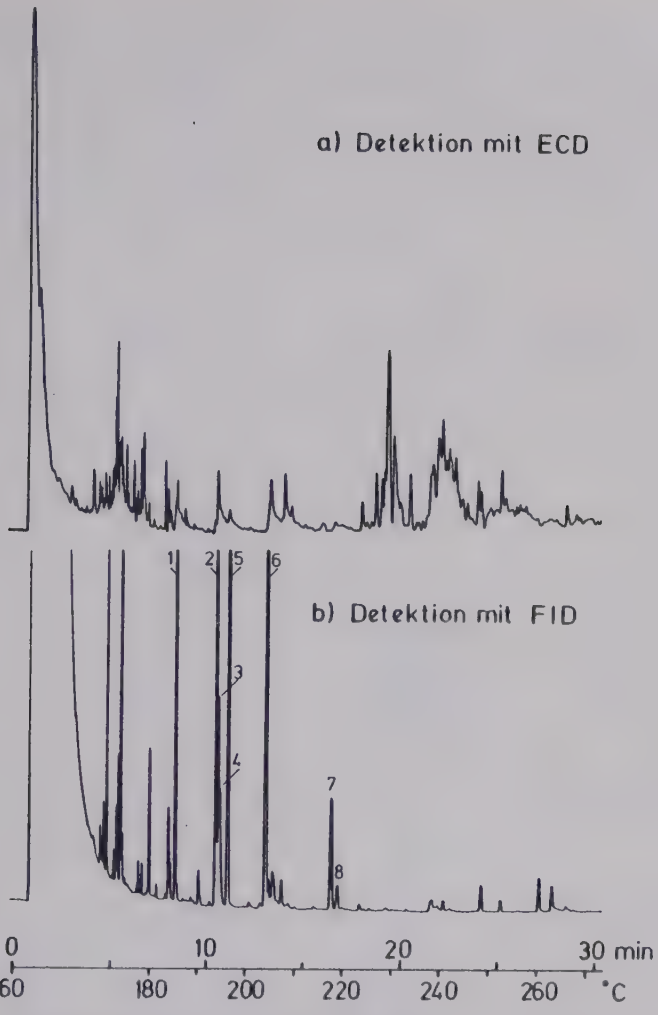


Abb. 43: Gaschromatographische Trennung umgeesterter Lipide (Hexanextrakt) aus Mikrosomen nach anaerober Metabolisierung von $^{14}CCl_4$.
Säule: Kapillarsäule 53 m (OV 101), Probenmenge 0,30 µl (splitlos)
a) Detektion mit Elektroneneinfangdetektor (ECD)
b) Detektion mit Flammenionisationsdetektor (FID)
1 = 16:0-ME, 2 = 18:2-ME, 3 = 18:1c-ME, 4 = 18:1t-ME,
5 = 18:0-ME, 6 = 20:4-ME, 7 = 22:6-ME, 8 = 22:5-ME

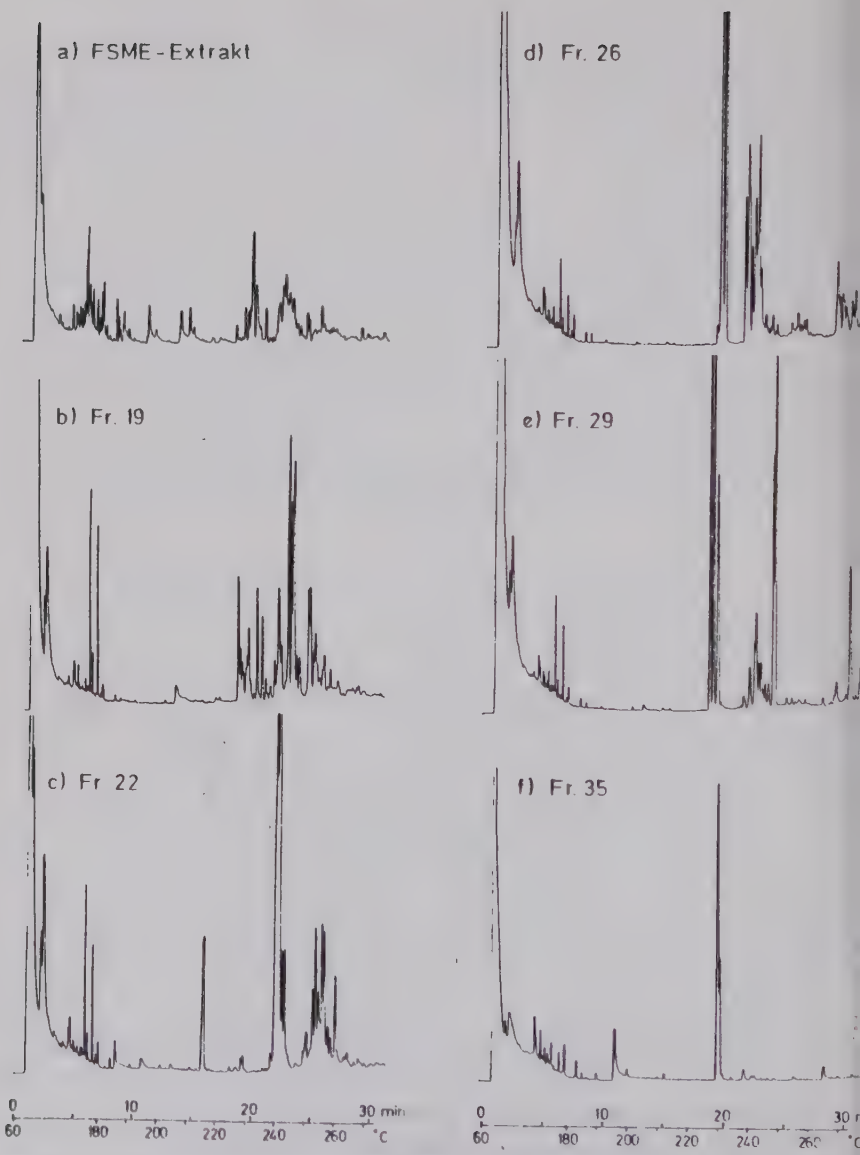


Abb. 44: Fraktionen der durch HPLC getrennten Fettsäuremethylesterverbindungen bei gaschromatographischer Analyse unter Verwendung eines

Ein Beweis, daß es sich bei diesen Verbindungen tatsächlich um Reaktionsprodukte von Fettsäuremethylestern mit CCl_4-Metaboliten handelt, war durch den Nachweis mit dem Elektroneneinfangdetektor allein nicht erbracht. Beispielsweise erzeugen auch Phthalsäureester, die wegen ihrer Verwendung als Weichmacher von Kunststoffen häufig als Verunreinigungen in lipophilen Lösungsmitteln enthalten sind, ebenfalls starke ECD-Signale (#125).

3.5.5. Strukturaufklärung kovalent modifizierter Fettsäuremethylester durch Gaschromatoraphie/Massenspektrometrie (GC/MS)

3.5.5.1. Nachweis chlorhaltiger Produkte durch negative chemische Ionisation

Ein eindeutiger Nachweis chlorhaltiger Verbindungen gelang durch GC/MS mit negativer chemischer Ionisation (NCI). Chlorhaltige Verbindungen lassen sich dabei durch das Auftreten der Fragmentionen m/z 35 und m/z 37 im Mengenverhältnis 3 : 1 (natürliche Isotopenverteilung von Chlor) erkennen.

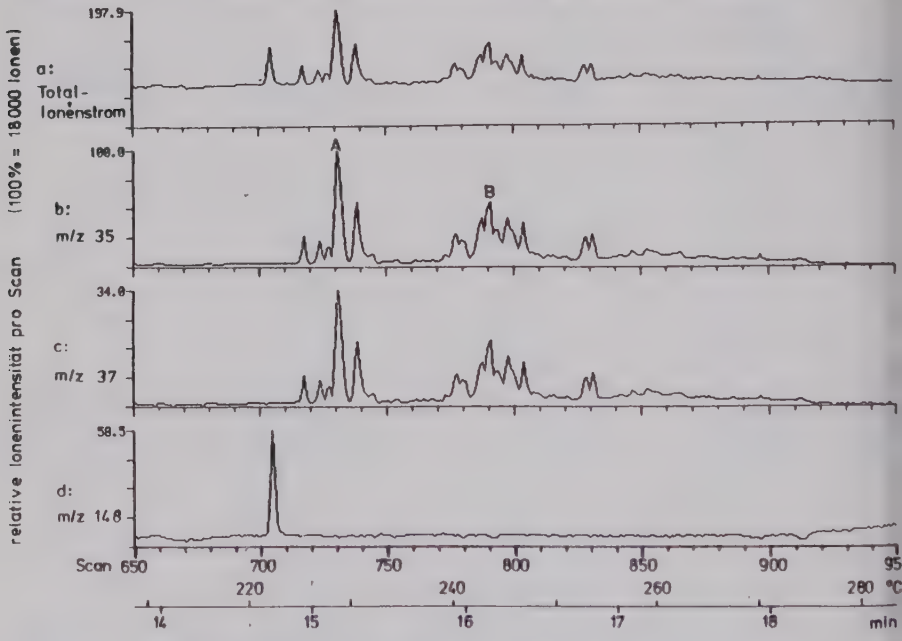


Abb. 45: GC/MS der umgeesterten Lipide (Hexanextrakt) aus Mikrosomen nach anaerober Metabolisierung von CCl_4 bei negativer chemischer Ionisation (NCI)

Abbildung 45 zeigt das NCI-Chromatogramm des Hexanextrakts (siehe 3.5.3.) bei Registrierung aller Fragmentionen im Bereich von m/z 30 - 500 (Abb. 45a; Totalionenstrom), darunter die entsprechenden Chromatogramme der Fragmentionen m/z 35 (Abb. 45b) und m/z 37 (Abb. 45c) bzw. m/z 148 (Abb. 45d). Andere negative Ionen trugen nur zum Untergrundrauschen bei.

Das Fragmention m/z 148, das als Phthalsäureanhydrid-Anion interpretiert wurde, dürfte aus Weichmachern stammen. Die Fragmentogramme der Ionen

m/z 35 (b) und m/z 37 (c) sind im Verhältnis 3 zu 1 deckungsgleich und zeigen damit spezifisch chlorhaltige Verbindungen an. Die Peaks in diesen Fragmentogrammen lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen; die erste Gruppe mit der Hauptkomponente A wird nach etwa 15 Minuten eluiert, die zweite Gruppe mit der Hauptkomponente B nach etwa 16 Minuten.

In Abb. 46 ist das NCI-Fragmentogramm des Ions m/z 35 dem Gaschromatogramm unter Verwendung des Elektroneneinfangdetektors (siehe 3.5.4.3.2.) gegenübergestellt.

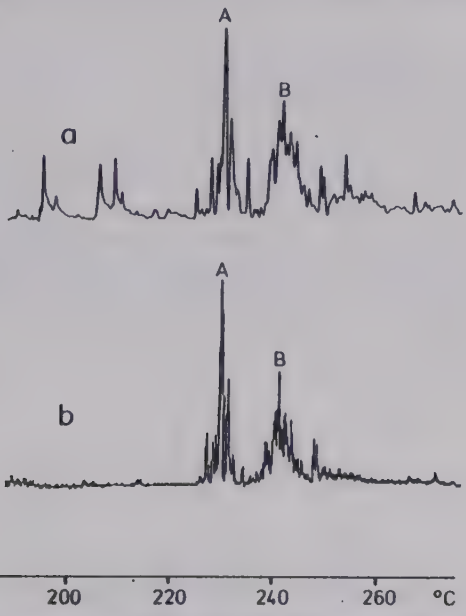


Abb. 46: Gaschromatographische Analyse der kovalent modifizierten Lipide nach Veresterung mit Methanol (Hexanextrakt)
a) bei Detektion mit dem Elektroneneinfangdetektor
b) bei GC/MS mit negativer chemischer Ionisation; Registrierung des Fragmentions m/z 35 (Cl^-)

Die Peakverteilungsmuster in beiden Chromatogrammen stimmen im wesentlichen miteinander überein, demnach handelte es sich bei den durch ECD nachgewiesenen Substanzen tatsächlich zum größten Teil um chlorhaltige Verbindungen.

Ein hierzu annähernd identisches Peakmuster in den Fragmentogrammen der Chlorionen ergab die GC/MS-Analyse der Methylesterderivate von Lipiden, die aus Lebermikrosomen von Ratten extrahiert wurden, nachdem die Tiere drei Stunden unter Hypoxie mit 80 mg Tetrachlormethan (per inhalationem) pro kg behandelt worden waren (#89). Daß es sich hierbei nicht um Artefakte handelt, die etwa bei der Probenaufarbeitung entstanden sein könnten, ließ sich durch Analyse entsprechender Proben aus unbehandelten Kontrolltieren zeigen, in denen sich keine chlorhaltigen Verbindungen nachweisen ließen.

3.5.5.2. Strukturaufklärung der chlorhaltigen Fettsäuremethylesteraddukte nach katalytischer Hydrierung

Um für die Strukturaufklärung der chlorhaltigen Verbindungen zunächst einheitlichere Produkte zu erhalten, wurde ein Teil des Hexanextrakts zur Reduktion von Doppelbindungen katalytisch hydriert. Trotzdem zeigten sich bei der Untersuchung dieser Probe durch GC/MS mit negativer chemischer Ionisation noch eine Vielzahl verschiedener Verbindungen (siehe Abb. 47), wobei sich wiederum zwei Peakgruppen mit den Hauptkomponenten A' bzw. B' unterscheiden lassen.

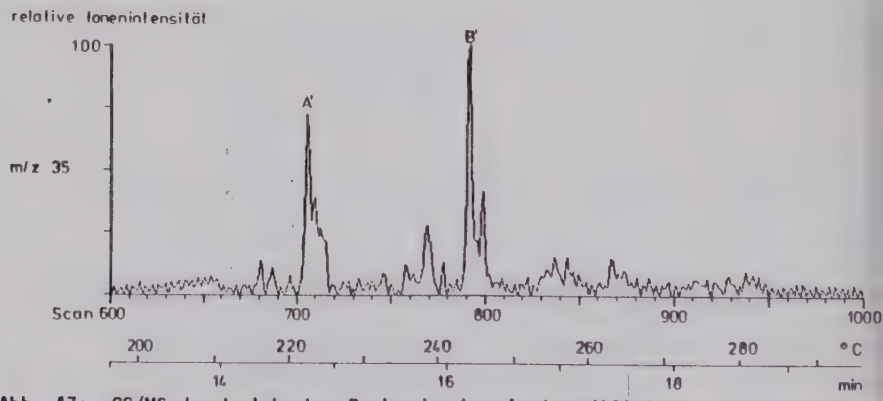


Abb. 47: GC/MS der hydrierten Probe der kovalent modifizierten Lipide nach Umesterung mit Methanol (Hexanextrakt) bei negativer chemischer Ionisation. Registriert wurde das Fragmention m/z 35 (Cl^-)

Da die Massenspektrometrie mit negativer chemischer Ionisation wegen fehlender Fragmentierung keine Information über die Struktur bzw. über die Anzahl der Chloratome im Molekül liefert, mußten andere Ionisationsverfahren zur massenspektrometrischen Strukturaufklärung herangezogen werden.

3.5.5.2.1. GC/MS des hydrierten Hexanextrakts mit Elektronenstoß-Ionisation

Die Interpretation der durch Elektronenstoß-Ionisation (EI) erzeugten Massenspektren bereitete gewisse Schwierigkeiten: Unglücklicherweise lagen die gaschromatographischen Retentionszeiten der Docosan- und Tetracosansäuremethylester (22:0- und 24:0-ME) im gleichen Bereich wie die der chlorhaltigen Verbindungen, was zu einer teilweisen Überlagerung dieser Spektren führte. Außerdem entstanden bei der Elektronenstoß-Ionisation überwiegend kleine Fragmentionen, aus denen nicht mehr auf die Struktur des Moleküls

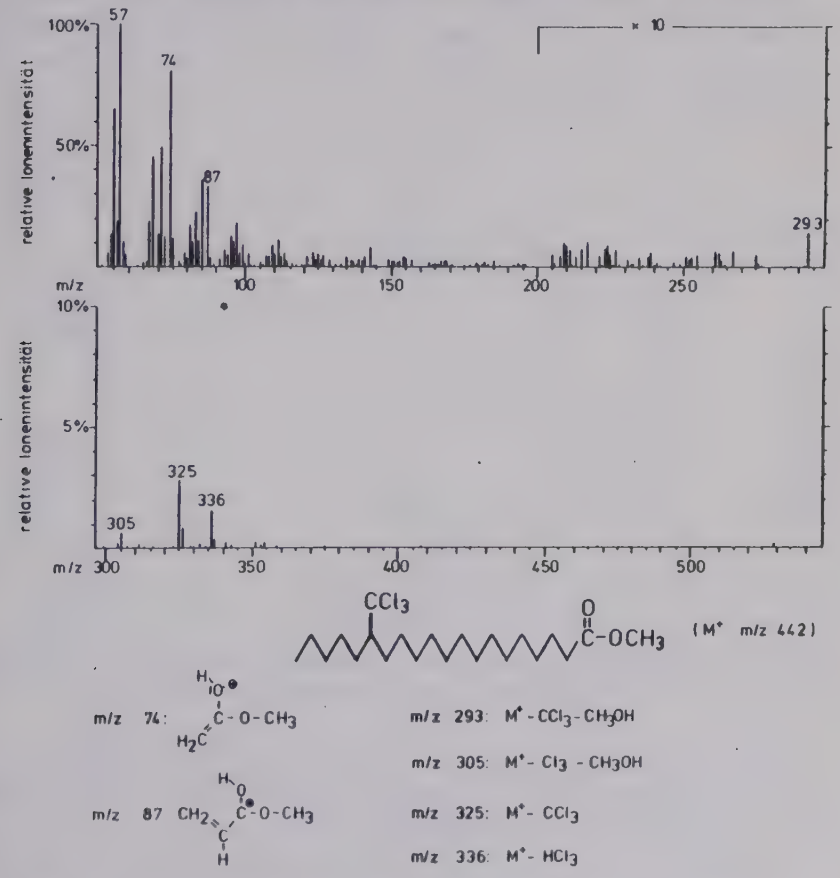


Abb. 48: Massenspektrum (EI) der Komponente B' (RT 16 min 12 sec) aus der hydrierten Probe des Hexanextrakts

geschlossen werden konnte. Abbildung 48 zeigt das EI-Spektrum der hydrierten Probe, aufgenommen bei der gleichen Retentionszeit, bei der unter den Verhältnissen der negativen chemischen Ionisation die Hauptkomponente B' eluiert wurde (RT 16 min 12 sec; Scan 792).

Das McLafferty-Produkt m/z 74 und das Fragmention m/z 87 sind als Hinweis auf Fettsäuremethylester anzusehen; diese Fragmente könnten aber auch aus nicht abgetrennten "normalen" Fettsäuremethylestern stammen. Die Fragmentionen m/z 293, m/z 305, m/z 325 und m/z 336 wurden als Spaltprodukte eines Trichlormethyleicosansäuremethylesters (M = 442) gedeutet; da damit jedoch kein chlorhaltiges Fragment nachgewiesen wurde, ist diese Zuordnung nicht zwingend. Die Massenfragmentogramme der angeführten Ionen sind in Abbildung 49 dargestellt.

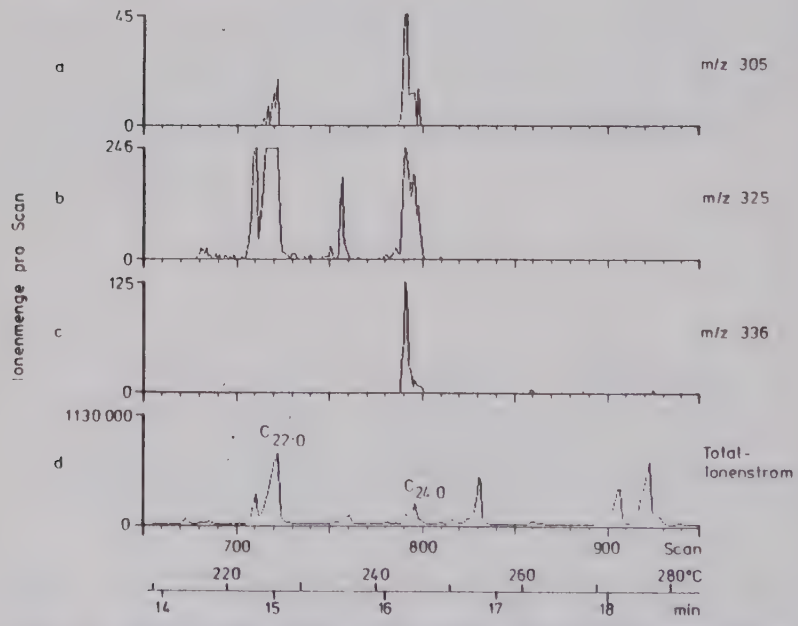


Abb. 49: Massenfragmentogramme der hydrierten Probe des Hexanextrakts bei GC/MS mit Elektronenstoß-Ionisation

3.5.5.2.2. GC/MS des hydrierten Hexanextrakts bei chemischer Ionisation mit Isobutan

Eine wesentlich geringere Fragmentierung der chlorhaltigen Verbindungen des hydrierten Hexanextrakts konnte durch die Methode der chemischen Ionisation mit Isobutan als Reaktantgas erzielt werden. In Abbildung 50 sind die Massenspektren dargestellt, die auf diese Weise bei den Retentionszeiten der Komponenten A' bzw. B' (siehe Abb. 47) registriert wurden.

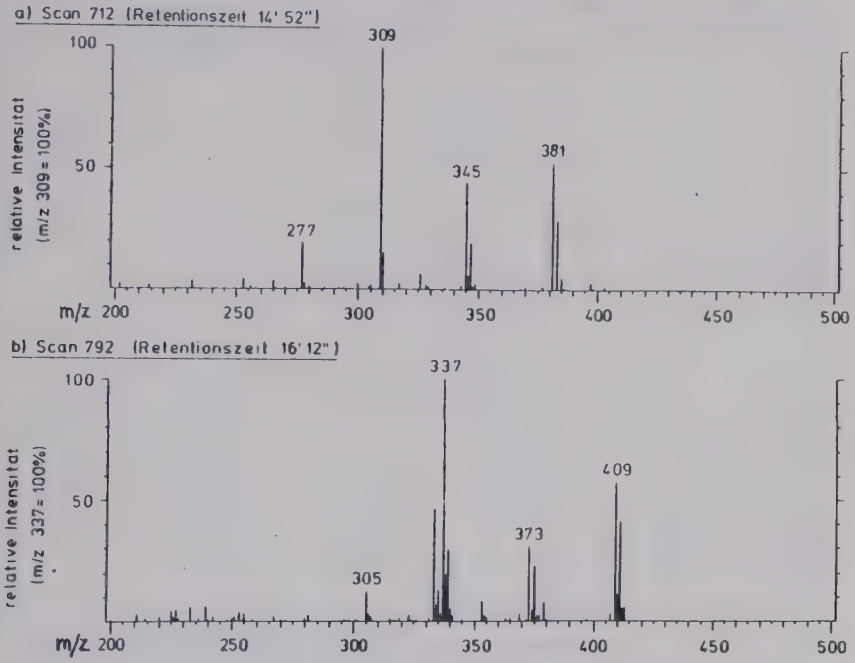


Abb. 50: Massenspektren der Komponenten A' (a) und B' (b) aus der hydrierten Probe des Hexanextrakts bei chemischer Ionisation mit Isobutan

Aus den Spektren geht eindeutig hervor, daß es sich bei den beiden Komponenten um Homologe handelt, die sich um die Masse 28 (C_2H_4) unterscheiden. Die gefundenen Fragmentionen wurden als Spaltprodukte der Methylester der Trichlormethyloctadecansäure (a) bzw. der Trichlormethyleicosansäure (b) interpretiert, wobei die einzelnen Fragmente durch sequenzielle Abspaltung von Chlorwasserstoff bei gleichzeitiger Anlagerung von Wasserstoffmolekülen und schließlicher Abspaltung der Methoxy-Gruppe entstanden

sind (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21:
Fragmentierung hydrierter Trichlormethylfettsäuremethylester bei chemischer Ionisation mit Isobutan

	Isotopenverteilung von Chlor	CCl_3-18:0-ME	CCl_3-20:0-ME	theor. Intensitätsverhältnis
Ausgangsverbindung:		Molekülmasse	Molekülmasse	
	$^{35}Cl_3$	414	442	1,00
	$^{35}Cl_2{}^{37}Cl$	416	444	0,95
	$^{35}Cl\ {}^{37}Cl_2$	418	446	0,30
	$^{37}Cl_3$	420	448	0,02
Fragmentionen:		m/z	m/z	
$MH^+ + H_2 - HCl$	$^{35}Cl_2$	381	409	1,0
	$^{35}Cl\ {}^{37}Cl$	383	411	0,6
	$^{37}Cl_2$	385	413	0,1
$MH^+ + H_2 - 2HCl$	^{35}Cl	345	373	1,0
	^{37}Cl	347	375	0,3
$MH^+ + H_2 - 3HCl$		309	337	
$MH^+ + H_2 - 3HCl - CH_3OH$		277	305	

Die protonierten Molekülionen MH^+ sind offensichtlich nicht stabil. Anhaltspunkte für die Anzahl der Chloratome in den einzelnen Fragmenten ergaben sich aus den charakteristischen Isotopenverteilungen.

In Abbildung 51 sind die Fragmentogramme der charakteristischen Fragmentionen aus den oben gezeigten Massenspektren dem Fragmentogramm des Chlorions m/z 35 bei der Massenspektrometrie mit negativer chemischer Ionisation (NCI) gegenübergestellt. Dieser Vergleich zeigt, daß es sich bei den durch NCI nachgewiesenen Substanzen der hydrierten Probe offenbar zum größten Teil um Stellungsisomere trichlormethylierter Methylester der Octadecansäure (vordere Peakgruppe) bzw. der Eicosansäure (hintere Peakgruppe) handelt.

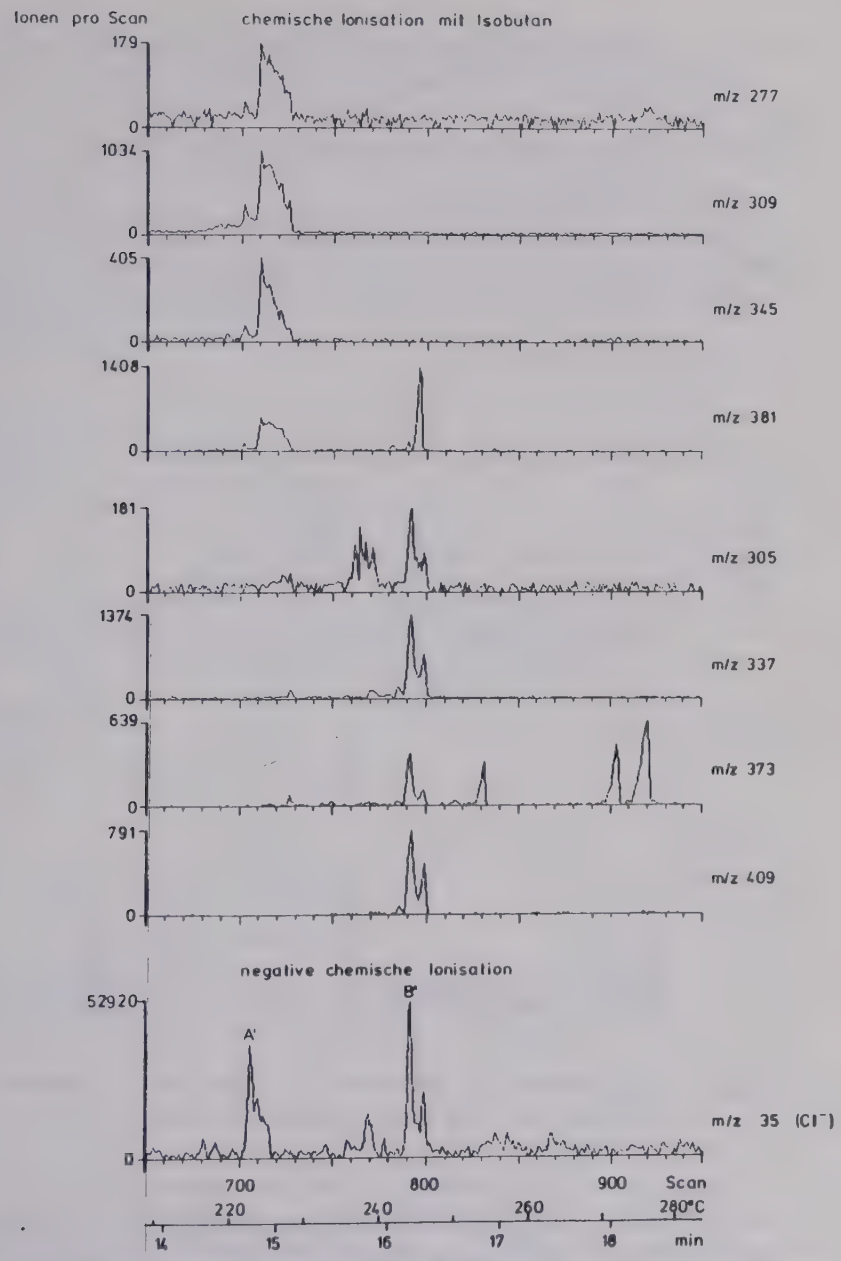


Abb. 51: Massenfragmentogramme aus der GC/MS-Analyse der hydrierten Probe

3.5.5.3. Strukturaufklärung der chlorhaltigen Verbindungen aus dem Hexanextrakt ohne vorherige katalytische Hydrierung

3.5.5.3.1. Gaschromatographie/Massenspektrometrie bei chemischer Ionisation mit Isobutan

Die Massenspektren, die bei der Elution der chlorhaltigen Komponenten A und B der nicht hydrierten Probe (siehe 3.5.5.1.) durch chemische Ionisation mit Isobutan erhalten wurden, sind in Abbildung 52 dargestellt.

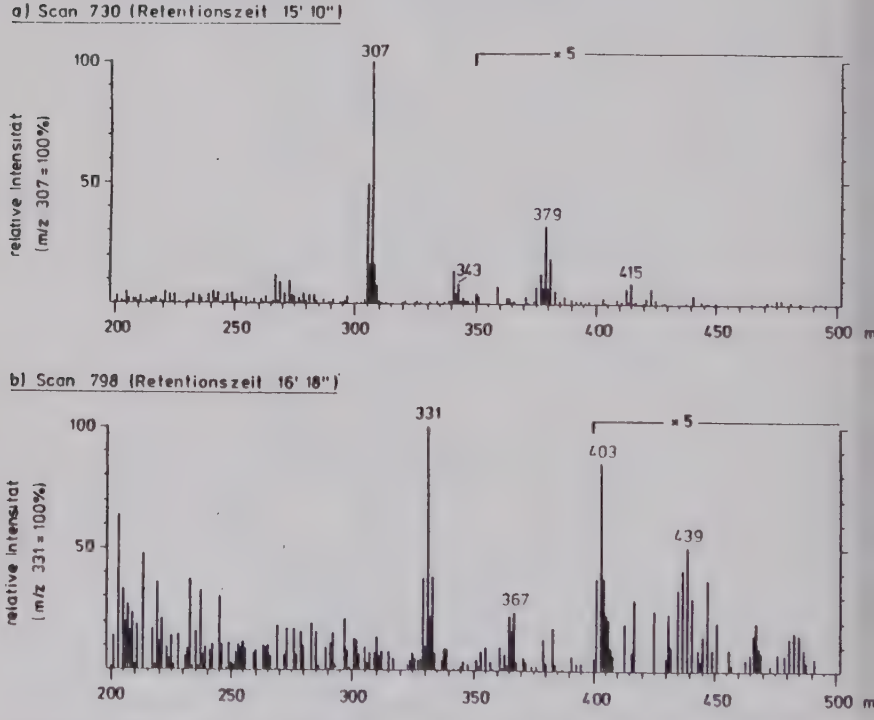


Abb. 52: Massenspektren der Komponenten A (a) und B (b) des Hexanextrakts der umgeesterten Lipide bei chemischer Ionisation mit Isobutan

Im Vergleich zur hydrierten Probe sind die Spektren nicht so klar; speziell Spektrum 52b enthält offenbar auch Fragmente aus nicht abgetrennten Verunreinigungen. Als charakteristisch für die Komponente A sind die Fragmentionen m/z 307, 343, 379 und 415, für Komponente B die Frag-

mentionen m/z 331, 367, 403 und 439 anzusehen, die in Analogie zur hydrierten Probe durch Anlagerung eines Wasserstoffmoleküls und sequenzieller Abspaltung von Chlorwasserstoff aus dem protonierten Methylester der einfach ungesättigten Trichlormethyloctadecensäure bzw. der dreifach ungesättigten Trichlormethyleicosatriensäure hervorgegangen sein dürften.

Daneben treten in den Spektren Fragmentionen auf, die um den Betrag 2 kleiner sind (m/z 305, 341, 377, 413 bzw. m/z 329, 365, 401, 437) und offenbar solche Fragmente repräsentieren, bei denen eine Wasserstoffanlagerung ausbleibt. Damit ergibt sich das in Tabelle 22 gezeigte Fragmentierungsschema.

Tabelle 22:

Fragmentierung ungesättigter Trichlormethylfettsäuremethylester bei chemischer Ionisation mit Isobutan

	Isotopenverteilung von Chlor	CCl_3-18:1-ME	CCl_3-20:3-ME
Ausgangsverbindung:		Molekülmasse	Molekülmasse
	$^{35}Cl_3$	412	436
Fragmentionen:		m/z	m/z
$MH^+ + H_2$ bzw. MH^+	$^{35}Cl_3$ / $^{35}Cl_2{}^{37}Cl$	415	439
MH^+	$^{35}Cl_3$	413	437
$MH^+ + H_2 - HCl$ bzw. $MH^+ - HCl$	$^{35}Cl_2$ / $^{35}Cl\,{}^{37}Cl$	379	403
$MH^+ - HCl$	$^{35}Cl_2$	377	401
$MH^+ + H_2 - 2HCl$ bzw. $MH^+ - 2HCl$	^{35}Cl / ^{37}Cl	343	367
$MH^+ - 2HCl$	^{35}Cl	341	365
$MH^+ + H_2 - 3HCl$		307	331
$MH^+ - 3HCl$		305	329

Vergleicht man die Fragmentogramme der Ionen m/z 305, 307 und 309 miteinander (Abbildung 53 oben), so fällt auf, daß das Fragmention m/z 305 relativ stärker in den zuerst eluierten Peaks, das Fragmention m/z 309 dagegen relativ stärker in den zuletzt eluierten Peaks vertreten ist. Daraus kann abgeleitet werden, daß vor bzw. nach der Elution von Isomeren des Trichlormethyloctadecensäuremethylesters auch geringe Mengen an Isomeren des zweifach ungesättigten Trichlormethyloctadecadiensäuremethylesters (Hauptfragment m/z 305) bzw. des gesättigten Trichlormethyloctadecansäuremethylesters (Hauptfragment m/z 309) eluiert werden, was mit der Trenncharakteristik der Gaschromatographie auf OV 101 vereinbar ist. Die Unterschiede in den Fragmentogrammen der Ionen m/z 329, 331 und 333 (Abbildung 53 Mitte) sind dagegen weniger eindeutig ausgeprägt.

Die Zuordnung der einzelnen Trichlormethylfettsäuremethylester zu den Peaks der chlorhaltigen Verbindungen, die bei der GC/MS-Analyse der Probe mit negativer chemischer Ionisation registriert wurden (m/z 35 = Cl^-), ergibt sich aus der Gegenüberstellung dieser Fragmentogramme (Abb. 53 unten).

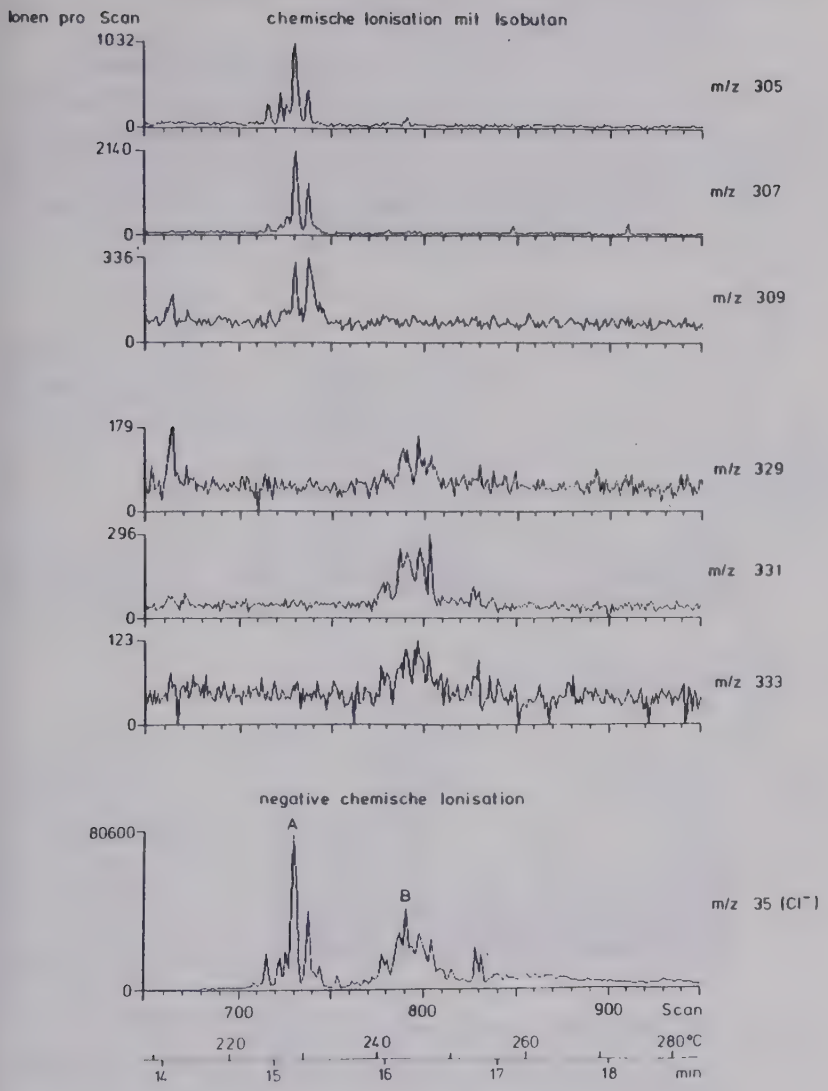


Abb. 53: Massenfragmentogramme aus der GC/MS-Analyse des Hexanextrakts bei chemischer Ionisation mit Isobutan bzw. bei negativer chemischer Ionisation (unten)

3.5.5.3.2. Gaschromatographie/Massenspektrometrie bei chemischer Ionisation mit Ammoniak

Zur weiteren Absicherung der Struktur dieser chlorhaltigen Fettsäuremethylester-Derivate wurde die chemische Ionisation bei der Massenspektrometrie unter Verwendung von Ammoniak als Reaktantgas durchgeführt, da hier der Nachweis ungespaltener Moleküle in Form ihrer Ammoniumaddukte $(M + 18)^+$ zu erwarten war. Solchermaßen erzeugte Massenspektren, die bei der Elution der Komponenten A bzw. B aufgenommen wurden, sind in Abbildung 54 gezeigt.

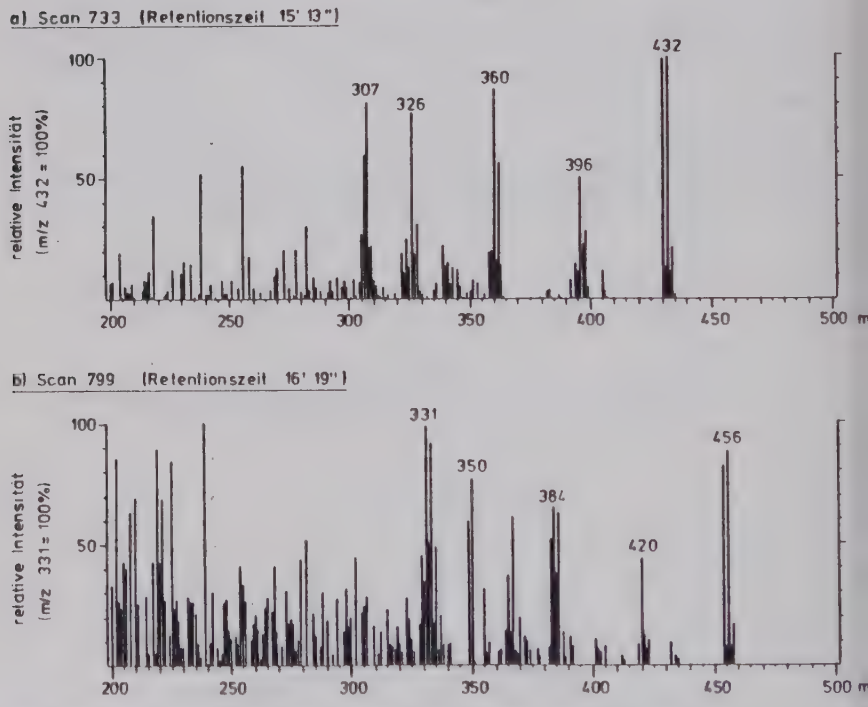


Abb. 54: Massenspektren der Komponenten A (a) und B (b) aus dem Hexanextrakt der umgeesterten Lipide bei chemischer Ionisation mit Isobutan

Tatsächlich wurden die Quasi-Molekülionen $(M + 18)^+$ mit relativ hohen Intensitäten gebildet, wobei aus dem charakteristischen Isotopenverteilungsmuster hervorgeht, daß es sich um Trichlor-Verbindungen handeln muß:

A: Trichlormethyloctadecensäuremethylester (Spektrum a) M = 412 ($^{35}Cl_3$)

B: Trichlormethyleicosatriensäuremethylester (Spektrum b) M = 436 ($^{35}Cl_3$)

Tabelle 23:

Fragmentierung ungesättigter Trichlormethylfettsäuremethylester bei chemischer Ionisation mit Ammoniak

	Isotopenverteilung von Chlor	CCl_3-18:1-ME	CCl_3-20:3-ME	theor. Intensitätsverhältnis
Ammoniumaddukt:		m/z	m/z	
$(M+NH_4)^+$	$^{35}Cl_3$	430	454	1,00
	$^{35}Cl_2\,^{37}Cl$	432	456	0,95
	$^{35}Cl\,^{37}Cl_2$	434	458	0,30
	$^{37}Cl_3$	436	460	0,02
Fragmentionen:		m/z	m/z	
$M + NH_4^+ - HCl + H_2$	$^{35}Cl_2$	396	420	
$M + NH_4^+ - HCl$	$^{35}Cl\,^{37}Cl$			
$M + NH_4^+ - 2HCl + 2H_2$	^{35}Cl	362	386	
$M + NH_4^+ - 2HCl + H_2$	^{37}Cl			
$M + NH_4^+ - 2HCl + H_2$	^{35}Cl	360	384	
$M + NH_4^+ - 2HCl$	^{37}Cl			
$M + NH_4^+ - 3HCl + 2H_2$		326	350	
$M + NH_4^+ - 3HCl + H_2$		324	348	
$MH^+ - 3HCl + H_2$		307	331	
$MH^+ - 3HCl$		305	329	

Analog zur Interpretation der Fragmentierung bei chemischer Ionisation mit Isobutan (siehe 3.5.5.3.1.) kann ein Teil der gefundenen Spaltprodukte durch sequenzielle Abspaltung von Chlorwasserstoff, Anlagerung von Wasserstoff und schließlich durch Abspaltung von Ammoniak erklärt werden (siehe Tabelle 23).

Da sich aus den Massenspektren keine Anhaltspunkte für die Position der Trichlormethylgruppe und der Doppelbindungen in der Fettsäurekette ergaben, sind die oben angegebenen Strukturformeln nur als ein Beispiel unter den zahlreichen, theoretisch möglichen Stellungsisomeren zu verstehen.

Die Elution mehrerer solcher Isomere lassen sich in den Fragmentogrammen der Quasi-Molekülionen m/z 430 (Trichlormethyloctadecensäure-ME) bzw. m/z 454 (Trichlormethyleicosatriensäure-ME) erkennen (siehe Abbildung 55). Diese Ionen sind jedoch nicht unbedingt spezifisch für die Trichlormethylverbindungen des Octadecensäure- bzw. Eicosatriensäure-Methylesters. Quasi-Molekülionen mit der gleichen Masse können aus entsprechend höher ungesättigten Fettsäuremethylester-Derivaten entstehen, wenn sie Trichlormethylreste mit dem Chlorisotop der Masse 37 enthalten. Solche Verbindungen müssen aber im Gegensatz zum stärker gesättigten Derivat auch Quasi-Molekülionen enthalten, deren Masse um den Betrag 2 geringer ist (Chlorisotop ^{35}Cl statt ^{37}Cl). Entsprechend umgekehrt sind die Verhältnisse für stärker gesättigte Fettsäurederivate.

In Abbildung 55 sind daher die Fragmentogramme entsprechender Quasi-Molekülionen dargestellt, deren Masse jeweils um 2 Atommassen differiert. Aus dieser Gegenüberstellung lassen sich die gleichen Schlüsse ziehen wie aus den Fragmentogrammen bei chemischer Ionisation mit Isobutan (vergleiche Abb. 53): Neben Isomeren des Trichlormethyloctadecensäure-Methylesters sind geringe Mengen isomerer Verbindungen des Trichlormethyloctadecadiensäure- und Trichlormethyloctadecansäure-Methylesters vorhanden; von den Trichlormethyl-Derivaten der Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 20 C-Atomen lassen sich dagegen nur Isomere der Trichlormethyleicosatriensäure eindeutig nachweisen. Der Vergleich mit dem Fragmentogramm m/z 35 aus der Massenspektrometrie bei negativer chemischer Ionisation zeigt ebenfalls, daß die Hauptmenge der dort nachgewiesenen chlorhaltigen Verbindungen den Trichlormethylfettsäure-Methylestern zugeordnet werden kann.

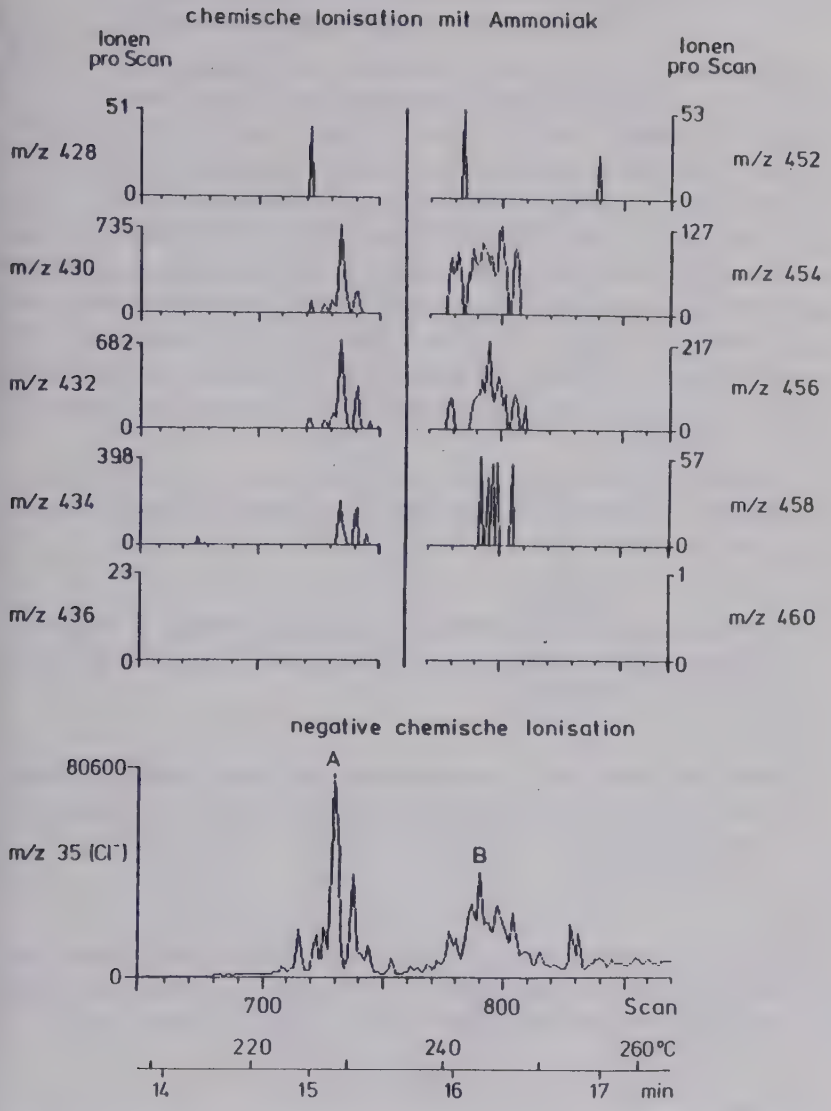


Abb. 55: Massenfragmentogramme aus der GC/MS-Analyse des Hexanextrakts bei chemischer Ionisation mit Ammoniak (oben) bzw. bei negativer chemischer Ionisation (unten)

3.5.5.4. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung der durch HPLC getrennten Fraktionen des Hexanextrakts

In den Fraktionen 17 bis 36 der HPLC-Trennung des Hexanextrakts ließen sich bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse mit negativer chemischer Ionisation eine große Zahl verschiedener chlorhaltiger Produkte nachweisen, die bei einer Säulentemperatur zwischen 210 und 270°C eluiert wurden. Die Verteilung der einzelnen Produkte auf die verschiedenen Fraktionen geht aus Abbildung 56 hervor, bei der die Fragmentogramme der Chlorionen (m/z 35 plus m/z 37) dargestellt sind. Für den quantitativen Vergleich war allen Fraktionen die gleiche Menge an Dibromstearinsäuremethylester als internem Standard zugesetzt worden; über die Integration der registrierten Bromionen (m/z 79 plus m/z 81) bei negativer chemischer Ionisation konnte eine einheitliche Normierung der Fragmentogramme erreicht werden.

Einzelne Fraktionen wurden durch GC/MS bei chemischer Ionisation mit Ammoniak näher untersucht. Dabei konnten folgende Trichlormethyl-Addukte identifiziert werden:

Fraktion 18:
Trichlormethyloctadecadiensäuremethylester (Retentionszeit 15 Minuten 11 Sekunden), Identifizierung durch die Quasi-Molekülionen m/z 428 und m/z 430 im Mengenverhältnis 1 : 1

Fraktion 26:
2 Isomere des Trichlormethyloctadecensäuremethylesters (Retentionszeiten 15 Minuten 13 Sekunden und 15 Minuten 19 Sekunden), Identifizierung durch die Quasi-Molekülionen m/z 430, m/z 432 und m/z 434 im Verhältnis 1 : 0,8 : 0,4

Fraktion 29:
2 Isomere des Trichlormethyloctadecensäuremethylesters (Retentionszeiten 14 Minuten 55 Sekunden und 15 Minuten 19 Sekunden), Identifizierung durch die Quasi-Molekülionen m/z 430, m/z 432 und m/z 434 im Verhältnis 1 : 0,9 : 0,5

Fraktion 35:
2 Isomere des Trichlormethyloctadecansäuremethylesters (Retentionszeiten 15 Minuten 16 Sekunden und 15 Minuten 22 Sekunden), Identifizierung durch die Quasi-Molekülionen m/z 432 und m/z 434 im Verhältnis 1 : 1,2

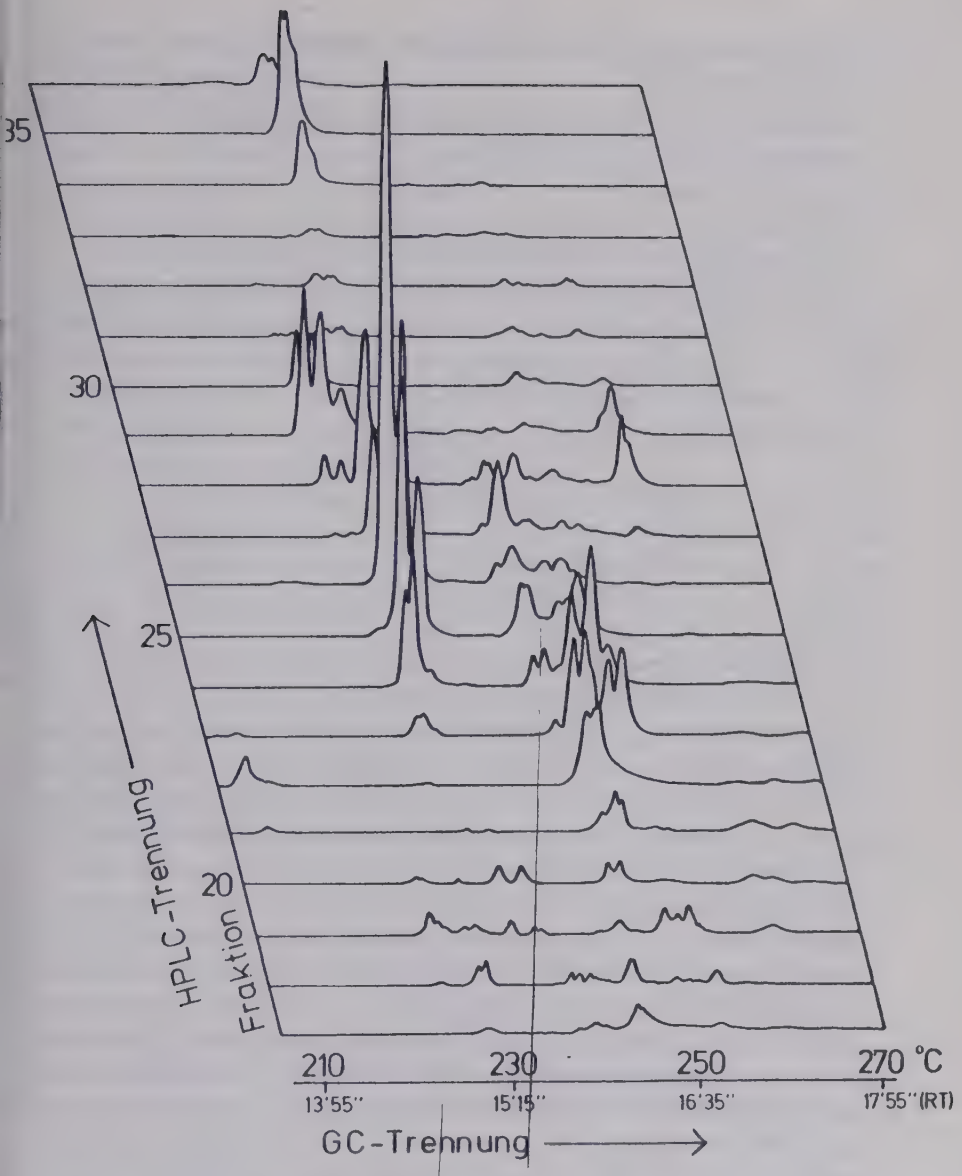


Abb. 56: GC/MS-Analyse bei negativer chemischer Ionisation von Fraktionen der HPLC-Trennung. Registriert wurde die Summe der Fragmentionen m/z 35 + m/z 37 (Cl^-)

Ein Vergleich der Elutionsvolumina der "normalen" mit den trichlormethylierten C_{18}-Fettsäuremethylestern bei der HPLC zeigt, daß die Einführung der Trichlormethylgruppe zu einer leichten Erhöhung des Elutionsvolumens führt (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24:
Elutionsvolumina von Fettsäuremethylestern und ihren Trichlormethyl-Derivaten bei der HPLC auf LiChrosorb RP-18

		20:4-ME: 14,8 ml	22:6-ME: 14,2 ml
	18:2-ME: 15,3 ml		22:5-ME: 15,7 ml
	CCl_3-18:2-ME: 17,5 ml		
16:0-ME: 20,6 ml	18:1-Me: 20,6 ml		
	CCl_3-18:1-ME: 25,5 ml		
	und 28,5 ml		
	18:0-ME: 33,7 ml		
	CCl_3-18:0-ME: 34,5 ml		

Damit lassen sich auch die Elutionsvolumina der Trichlormethyl-Verbindungen anderer Fettsäuremethylester extrapolieren. In Verbindung mit dem Trennverhalten bei der Gaschromatographie kann daraus abgeleitet werden, daß es sich bei den in Fraktion 21 bis 28 durch negative chemische Ionisation nachgewiesenen Verbindungen mit gaschromatographischen Retentionszeiten zwischen 16 und 17 Minuten um verschiedene Stellungsisomere des Trichlormethyleicosatriensäure-Methylesters handelt. Bei der in Fraktion 22 mit einer gaschromatographischen Retentionszeit von knapp 14 Minuten eluierten Verbindung könnte es sich demnach um eine Trichlormethylverbindung des Hexadecansäure-Methylesters handeln, bei den in Fraktion 28 und 29 mit gaschromatographischen Retentionszeiten von ca. 17 Minuten eluierten Verbindungen möglicherweise um Trichlormethyldocosapentaensäure-Methylester. Für eine massenspektrometrische Identifizierung mittels chemischer Ionisation mit Ammoniak waren die vorhandenen Substanzmengen dieser Verbindungen jedoch zu gering.

3.5.5.5. Quantifizierung der gefundenen Trichlormethyl-Fettsäuremethylester durch GC/MS

Unter der Annahme, daß es sich bei den Verbindungen, die massenspektrometrisch bei negativer chemischer Ionisation nachgewiesen werden konnten, ausschließlich um Trichlormethylderivate von Fettsäuremethylestern handelt, läßt sich die quantitative Menge dieser Verbindungen abschätzen:

Den untersuchten Proben wurde eine definierte Menge Dibromstearinsäuremethylester als internem Standard zugesetzt und bei der anschließenden gaschromatographisch/massenspektrometrischen Untersuchung bei negativer chemischer Ionisation die Ionenausbeuten der Chlorionen (m/z 35) mit denen der Bromionen (m/z 79) verglichen (siehe 2.5.3.3.6.). Nach dieser Berechnungsmethode waren in 25 µl des Hexanextrakts 9,1 nMol an Trichlormethylverbindungen durch GC/MS nachweisbar.

Die gleiche Probenmenge enthielt 23,9 nCi an radioaktivem Material, was bei einer spezifischen Radioaktivität von 1,82 Ci/Mol des metabolisierten Tetrachlormethans einem Gehalt von 13,1 nMol kovalent an Lipide gebundener CCl_4-Metaboliten entspricht. Aus den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie (siehe 3.5.4.1.) sowie der HPLC (3.5.4.2.) geht jedoch hervor, daß nur 41 Prozent der lipidgebundenen Radioaktivität, also 5,4 nMol, als Fettsäuremethylester-Verbindungen charakterisiert werden können. Der über die Massenspektrometrie berechnete Gehalt an Trichlormethylfettsäure-Methylestern liegt damit um den Faktor 1,7 über dem Wert, der auf Grundlage der Radioaktivitätsbestimmung zu erwarten ist.

Eine entsprechende quantitative Bestimmung der Trichlormethylverbindungen wurde in den durch HPLC getrennten Fraktionen 17 bis 37 durchgeführt. Die Ergebnisse dieser massenspektrometrischen Bestimmung sind in Abbildung 57 den Werten aus der Radioaktivitätsbestimmung (3.5.4.2) gegenübergestellt.

Fast in allen Fraktionen lag der Gehalt an Trichlormethylderivaten nach der massenspektrometrischen Bestimmungsmethode über den entsprechenden Werten aus der Bestimmung der Radioaktivität; die qualitativ ähnlichen Verteilungsmuster zeigen jedoch, daß beide Bestimmungsmethoden miteinander korrelieren. Eine Aufsummierung aller untersuchten Fraktionen ergab ein Verhältnis von 140 nMol Trichlormethyl-Fettsäuremethylester (massenspektrometrisch berechnet) gegenüber 86 nMol kovalent modifizierter Lipidverbindungen (über Radioaktivität errechnet). Dieses Verhältnis von 1,63 : 1 entspricht ziemlich genau dem Wert, der im nicht aufgetrennten Hexanextrakt gefunden wurde (siehe oben).

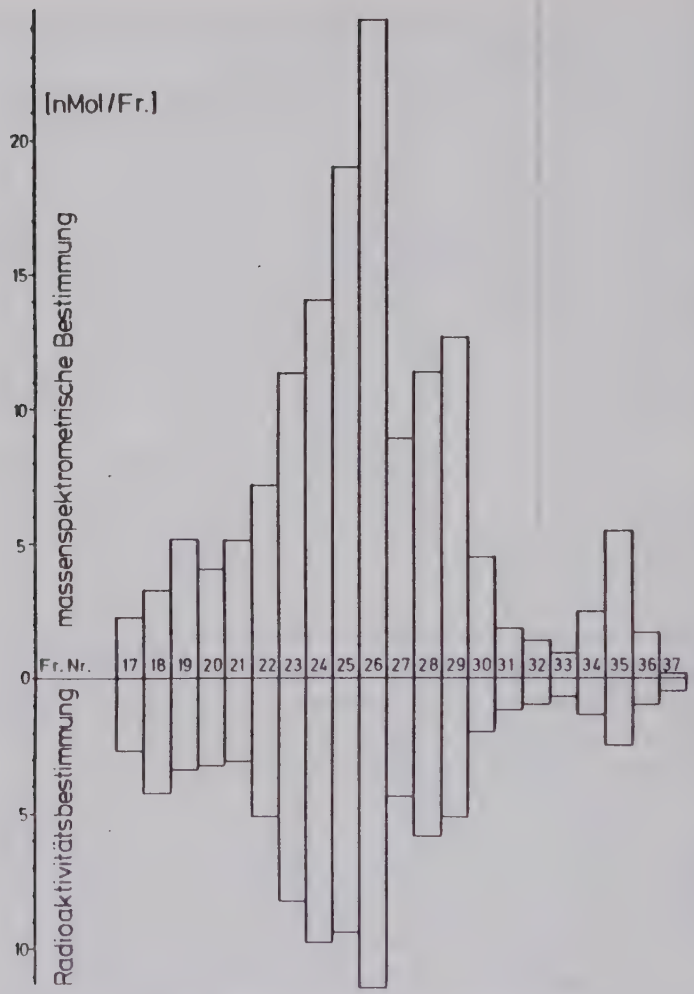


Abb. 57: Quantitative Bestimmung der Trichlormethyl-Verbindungen in den durch HPLC getrennten Fraktionen des Hexanextrakts bei massenspektrometrischer Berechnung (Balken nach oben) bzw. bei Berechnung aus der Radioaktivität (Balken nach unten)

Der Grund für die Diskrepanz zwischen den massenspektrometrisch und den über die Radioaktivität ermittelten Werten dürfte daher in einem systematischen Fehler bei einer der beiden Meßmethoden liegen. Zu niedrige Werte bei der Radioaktivitätsbestimmung sind beispielsweise dann zu erwarten, wenn die spezifische Aktivität des im Versuch eingesetzten Tetrachlormethans in Wirklichkeit geringer als angenommen war; dies könnte etwa durch Zersetzung des hochmarkierten Tetrachlormethans vor der Verdünnung mit nichtradioaktivem Tetrachlormethan oder durch Fehler bei der Verdünnung selbst hervorgerufen worden sein. Andererseits könnten Fehler bei der massenspektrometrischen Bestimmung darauf beruhen, daß die relativen Ionenausbeuten der Chlor- bzw. Brom-haltigen Fettsäuremethylester bei der negativen chemischen Ionisation von der Art und Menge der Proben beeinflußt werden. Beim Elektroneneinfangdetektor, bei dem die Bildung von Halogenanionen auf einem ähnlichen Mechanismus wie bei der negativen chemischen Ionisation beruht, sind solche Erscheinungen jedenfalls bekannt.

Die bei negativer chemischer Ionisation nachgewiesenen chlorhaltigen Verbindungen können entsprechend ihrer gaschromatographischen Retentionszeiten in vier Gruppen eingeteilt werden. Nach der massenspektrometrischen Berechnung entfallen auf die einzelnen Gruppen dabei folgende Anteile an Trichlormethylverbindungen:

Tabelle 25:
Verteilung von Trichlormethylverbindungen entsprechend ihrer gaschromatographischen Retentionszeiten

Gruppe	Retentionszeit (GC-Trennung)	Menge an Trichlormethyl-Verbindungen	Prozent-Anteil	Zuordnung
1	13,5 - 14,5 min	0,05 nMol/25 µl	0,5 %	(C_{16}-FSME)
2	14,5 - 15,8 min	3,30 nMol/25 µl	36,2 %	C_{18}-FSME
3	15,8 - 18,3 min	5,36 nMol/25 µl	58,9 %	C_{20}-FSME
4	18,3 - 20,5 min	0,40 nMol/25 µl	4,4 %	(C_{22}-FSME)
Summe	13,5 - 20,5 min	9,11 nMol/25 µl	100,0 %	

Nach den bisherigen Analysen sind die Verbindungen in Gruppe 2 als Trichlormethylderivate von Fettsäuremethylestern mit einer Kettenlänge von 18 C-Atomen, in Gruppe 3 als Trichlormethylderivate von Fettsäuremethylestern mit einer Kettenlänge von 20 C-Atomen im Fettsäurerest

anzusehen. Nach den Retentionszeiten zu schließen, könnte es sich bei den Verbindungen in Gruppe 1 um Trichlormethylderivate von Fettsäuremethylester mit einer Kettenlänge von 16 C-Atomen, bei Gruppe 4 um entsprechende Verbindungen mit einer Kettenlänge von 22 C-Atomen im Fettsäurerest handeln (siehe auch 3.5.5.4.); für eine Strukturaufklärung durch chemische Ionisation mit Isobutan oder Ammoniak waren die vorhandenen Mengen dieser Substanzen jedoch zu gering.

Die zur massenspektrometrischen Quantifizierung eingesetzte Probenmenge entsprach dem Lipidmaterial, das aus einer Mikrosomenmenge mit 0,23 mg Protein isoliert wurde. Bezogen auf ein Milligramm mikrosomales Protein entstanden damit rund 24 nMol trichlormethylierter Fettsäureverbindungen mit einer Kettenlänge von 20 C-Atomen und rund 15 nMol trichlormethylierter Fettsäureverbindungen mit einer Kettenlänge von 18 C-Atomen. Verglichen mit dem mikrosomalen Gehalt an Arachidonsäure bzw. an ungesättigten C_{18}-Fettsäuren betrug der Anteil der Trichlormethylverbindungen etwa jeweils fünf Prozent der Fettsäuren mit gleicher Kettenlänge.

Die kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten an mikrosomale Lipide beträgt unter anaeroben Verhältnissen ungefähr 40 Prozent der metabolisierten CCl_4-Menge (siehe 3.5.i.). Die gefundenen Trichlormethylverbindungen repräsentieren rund 40 Prozent der lipidgebundenen Radioaktivität und damit insgesamt etwa 16 Prozent des metabolisierten Tetrachlormethans.

3.5.6. Mechanismus der kovalenten Bindung von Tetrachlormethan-Metaboliten an Lipide

Mikrosomale Lipide enthalten an ungesättigten Fettsäuren vor allem Arachidonsäure, $C_{20:4}$, und Linolsäure, $C_{18:2}$ (siehe 3.5.4.3.1.). In den kovalent modifizierten Lipiden sind nach den massenspektrometrischen Untersuchungen hauptsächlich Isomere der Trichlormethyleicosatrien- und der Trichlormethyloctadecensäure vertreten, in geringen Mengen auch Trichlormethylverbindungen der Octadecan- und Octadecadiensäure; Trichlormethylderivate der Eicosatetraensäure waren dagegen massenspektrometrisch nicht nachweisbar. Demnach erfolgt die Bildung der Trichlormethylverbindungen bevorzugt durch Addition eines CCl_3-Radikals an eine Fettsäure-Doppelbindung, wobei das entstandene Trichlormethyl-Fettsäureradikal durch Aufnahme eines Wasserstoffatoms in das entsprechend stärker gesättigte Fettsäurederivat übergeht (siehe Abbildung 58). Eine Anlagerung von CCl_3-Radikalen unter

Erhalt bzw. Umlagerung der Doppelbindung ist offenbar weit seltener; außer durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms aus dem CCl_3-Fettsäureradikal wäre dies als Dimerisierungsreaktion zwischen CCl_3-Radikalen und Fettsäureradikalen mit Pentadienylstruktur denkbar:

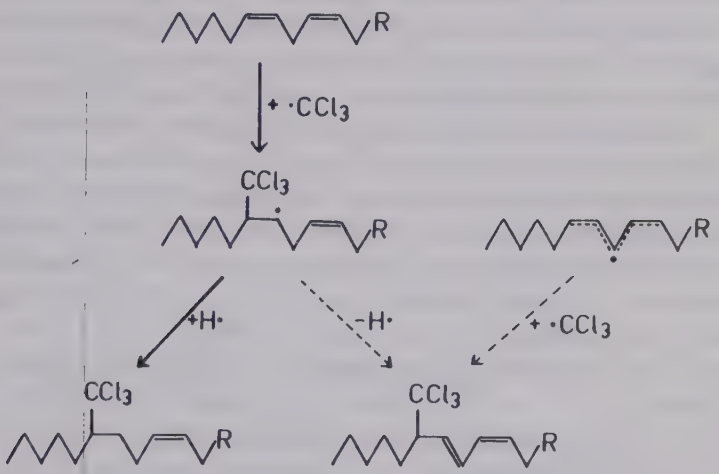


Abb. 58: Mechanismus der Addition von Trichlormethylradikalen an ungesättigte Fettsäuren (Linolsäure: R = $-(CH_2)_6-COOH$)

Nach unseren Untersuchungen erfolgt die Addition von Trichlormethylradikalen an Doppelbindungen der Arachidonsäure, der Linolsäure und der Ölsäure; eine Addition an Docosahexaensäure ist nicht gesichert.

In der Literatur gab es schon seit langem Hinweise für eine Addition von Trichlormethyl-Radikalen an Fettsäuredoppelbindungen. Gordis (#56) fand nach Behandlung von Ratten mit $^{14}C^{36}Cl_4$ in vivo eine Addition von ^{14}C zu ^{36}Cl im molaren Verhältnis 1 zu 3 bei gleichzeitiger Bildung verzweigter Fettsäuren. Ähnliche Additionsprodukte konnte er durch radikalische Reaktion von Tetrachlormethan und Ölsäuremethylester mit Benzoylperoxid als Radikalstarter unter Verlust der Fettsäure-Doppelbindung herstellen, was aber zu einer Addition von C zu Cl im Verhältnis 1 zu 4 führte.

Villarruel et al. (#182) synthetisierten nach dieser Methode mit Tetrachlormethan und den Methylestern der Öl-, Linol-, Linolen- und Arachidonsäure entsprechende Additionsverbindungen, die bei der gaschromatographischen Trennung ähnliche Retentionszeiten aufwiesen wie die in vitro

nach mikrosomaler Metabolisierung von Tetrachlormethan unter anaeroben Bedingungen isolierten kovalent-modifizierten Fettsäuremethylester.

Trudell et al. (#173) konnten im rekonstituierten System aus Cytochrom P-450, NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase und Cytochrom b_5 in Phospholipidvesikeln, die mit Dioleylphosphatidylcholin angereichert waren, die Bildung von Trichlormethyloctadecansäure durch Gaschromatographie/Massenspektrometrie bei chemischer Ionisation mit Ammoniak nachweisen, also die Addition des Trichlormethyl-Radikals unter Verlust der Doppelbindung.

Massenspektrometrische Hinweise gibt es ebenfalls für eine Trichlormethylierung von Cholesterin in vivo bei der Behandlung von Ratten mit Tetrachlormethan (#3). Ob die massenspektrometrischen Daten tatsächlich nur für eine Anlagerung des Trichlormethyl-Radikals unter Erhalt der Doppelbindung sprechen, wie die Autoren argumentieren, erscheint jedoch fraglich: Die Autoren verwendeten bei ihren Versuchen $^{14}CCl_4$ und $C^{36}Cl_4$ mit einer spezifischen Aktivität von 3,4 Ci/Mol bzw. 0,17 Ci/Mol. Bei vollständiger radioaktiver Markierung wäre für $^{14}CCl_4$ und $C^{36}Cl_4$ eine spezifische Aktivität von 62 Ci/Mol bzw. 4,8 Ci/Mol zu erwarten, d.h. nur ca. 5 Prozent des eingesetzten Tetrachlormethans enthielt tatsächlich die radioaktiven Isotope. Die Argumentation der Autoren beruht jedoch auf der Annahme, daß die bei der Massenspektrometrie gefundenen Fragmentionen ausschließlich radioaktive Isotope, also ^{14}C bzw. ^{36}Cl in der angelagerten Trichlormethylgruppe enthalten, was zu falschen Schlußfolgerungen bezüglich der Masse des Cholesterinrestes führt. Auch ist der vorgeschlagene Mechanismus - Anlagerung eines CCl_3-Radikals an ein zuvor durch Abstraktion von Wasserstoff gebildetes Cholesterin-Radikal - wegen der kurzen Lebensdauer dieser Radikale unwahrscheinlich.

3.6. Hydrolyse kovalent modifizierter Phospholipide durch Phospholipase A2

In den 1,2-Diacyl-sn-glycerinphosphatiden höherer Organismen sind die gesättigten Fettsäuren hauptsächlich über die Hydroxylgruppe an C-Atom 1, die ungesättigten Fettsäuren dagegen hauptsächlich an C-Atom 2 des Glycerins verestert (#58). Da als Angriffspunkte der reaktiven CCl_4-Metaboliten die Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäurereste in den Phospholipiden in Betracht kommen, sollte der Anteil kovalent modifizierter Fettsäuren in sn-2-Position der Glycerinphosphatide höher sein als in sn-1-Position. Spaltung der Phospholipide mit Phospholipase A_2 und anschließende Extraktion der freigesetzten Fettsäuren sollte im Vergleich zur nichtenzymatischen Hydrolyse zu einer "Anreicherung" der modifizierten Fettsäuren führen. Dies war zunächst der Ausgangspunkt für die Versuche mit Phospholipase A_2.

3.6.1. Hydrolyse von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A2 aus Schlangengift (Naja naja)

Für Vorversuche standen Rattenlebermikrosomen zur Verfügung, die mit $[^{14}C]$-Tetrachlormethan mit einer spezifischen Aktivität von 3,5 Ci/Mol unter Stickstoff inkubiert worden waren. Aus den daraus extrahierten Lipiden wurde durch Säulenchromatographie eine Phosphatidylcholin-haltige Fraktion isoliert, die entsprechend ihrer Radioaktivität 11 nMol kovalent gebundener CCl_4-Metaboliten enthielt. Der Phosphatidylcholin-Gehalt selbst wurde nicht bestimmt, lag aber aufgrund der eingesetzten Mikrosomenmenge (1,5 mg mikrosomales Protein) sicherlich unter einem µMol. Diese Fraktion wurde 12 Stunden mit vier Enzymeinheiten Phospholipase A_2 aus Schlangengift (Naja naja) inkubiert. Obwohl dabei vollständige Hydrolyse erwartet wurde, ging aus der Analyse der dünnschichtchromatographisch getrennten Produkte hervor, daß nur 54 Prozent der radioaktiven Markierung als freie Fettsäuren vorlagen. Die restlichen 46 Prozent waren an nicht hydrolysiertem Phosphatidylcholin gebunden, von dem densitometrisch nur noch geringe Mengen nachgewiesen wurden. Das bei der Reaktion gebildete Lysophosphatidylcholin enthielt keine radioaktive Markierung; Fettsäuren in sn-1-Position waren demnach nicht kovalent modifiziert.

Das mit Phospholipase A_2 nicht umsetzbare Phosphatidylcholin ließ sich durch Methanolyse mit Bortrifluorid als Katalysator spalten. 75 Prozent der dabei entstandenen radioaktiv markierten Produkte konnten mit n-Hexan extrahiert werden; ihre dünnschichtchromatographischen R_f-Werte entsprachen denen normaler Fettsäuremethylester. Der relative Anteil kovalent

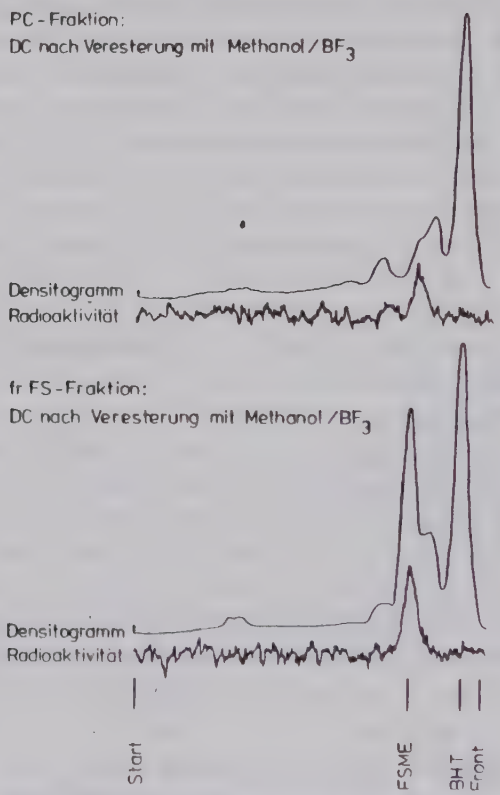


Abb. 59: Dünnschichtchromatographische Analyse von kovalent modifiziertem Phosphatidylcholin (PC) nach Behandlung mit Phospholipase A_2 aus Schlangengift:

oben: durch Phospholipase nicht umsetzbares PC nach Umesterung mit Methanol/BF_3

unten: durch Phospholipase abgespaltene Fettsäuren (fr. FS) nach Veresterung mit Methanol/BF_3

Densitogramme bei 600 nm nach Veraschung mit Kupferacetat-Reagens

gebundener CCl_4-Metaboliten war in diesen Produkten offensichtlich höher als in den Methylestern der enzymatisch hydrolysierten Fettsäuren; dies ergab sich bei dünnschichtchromatographischer Analyse aus dem Verhältnis zwischen registrierter Radioaktivität und den densitometrisch ermittelten Peakflächen für die Fettsäuremethylester (siehe Abbildung 59).

Eine Zunahme der spezifischen kovalenten Bindung (gebundene CCl_4-Metaboliten pro Phospholipid) in enzymatisch nicht hydrolysiertem Phosphatidylcholin würde bedeuten, daß durch reaktive CCl_4-Metaboliten modifiziertes Phosphatidylcholin ein schlechteres Substrat für Phospholipase A_2 darstellt. Dies wurde in weiteren Experimenten unter Verwendung von Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas genauer geprüft.

3.6.2. Hydrolyse von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A2 aus Schweinepankreas

Das für diese Versuche eingesetzte Phosphatidylcholin wurde durch dünnschichtchromatographische Trennung aus dem Lipidextrakt von Rattenlebermikrosomen isoliert, die eine Stunde mit $[^{14}C]$-Tetrachlormethan mit einer spezifischen Aktivität von 1,82 Ci/Mol unter Stickstoff inkubiert worden waren (siehe 3.5.1. und 3.5.2.).

Die isolierte Phosphatidylcholin-Fraktion enthielt 34 mMol kovalent gebundener CCl_4-Metaboliten pro Mol Lipid-Phosphat. Der Anteil an Lysophosphatidylcholin lag bei knapp zwei Mol-Prozent, bezogen auf den Phosphatgehalt. Eine Verunreinigung durch Sphingomyelin konnte bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie nicht festgestellt werden. Die Fettsäurezusammensetzung der "normalen" Fettsäuren im isolierten Phosphatidylcholin wurde nach Zusatz von Heptadecansäure als internem Standard gaschromatographisch bestimmt und ergab folgende Werte (in mMol Fettsäure pro Mol Phosphat):

	16:0	18:0	18:1c	18:1t	18:2	20:4	22:6	Summe
Gesamt-Fettsäuren	610±15	544±9	72±5	41±5	331±14	486±17	67±4	2151
freie Fettsäuren	92±10	58±1	42±7	0	14±4	4±2	4±3	214
veresterte Fettsäuren (Differenz)	518±11	486±9	30±5	41±5	317±13	482±17	63±3	1937

Die Gesamt-Fettsäuren wurden als Fettsäuremethylester nach Umesterung mit Methanol/Bortrifluorid bestimmt, die freien Fettsäuren nach Veresterung mit Diazomethan.

Zur enzymatischen Hydrolyse wurde das isolierte Phosphatidylcholin in einer Konzentration von 161 µM, bezogen auf den Phosphatgehalt, mit 32 Enzymeinheiten Phospholipase A_2 pro ml umgesetzt (siehe 2.6.2.).
Bei Versuchsbeginn und zehn, zwanzig, vierzig und achzig Minuten später wurden gleiche Volumina der Inkubationslösung entnommen, daraus die Lipide extrahiert und auf ihren Gehalt an Phosphat, Radioaktivität, freien und veresterten Fettsäuren untersucht. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 26:
Hydrolyse von Phosphatidylcholin mit Phospholipase A_2 nach kovalenter Bindung von CCl_4-Metabiliten

Zeit [min]	extrahierte Phosphatmenge [nMol P/ml]	kovalente Bindung CCl_4-Metaboliten* [nMol/ml]	freie Fettsäuren** [Mol/Mol P]	Gesamt-Fettsäuren** [Mol/Mol P]
0	161 ± 3 (100 %)	5,62 ± 0,07 (100 %)	0,20 ± 0,01	2,18 ± 0,04 (100 %)
10	158 ± 3 (98 %)	5,51 ± 0,11 (98 %)	1,05 ± 0,03	2,13 ± 0,05 (98 %)
20	155 ± 2 (96 %)	5,59 ± 0,03 (99 %)	1,05 ± 0,03	2,12 ± 0,04 (97 %)
40	153 ± 5 (95 %)	5,59 ± 0,04 (99 %)	1,14 ± 0,02	2,13 ± 0,03 (98 %)
80	146 ± 5 (91 %)	5,54 ± 0,07 (99 %)	1,18 ± 0,04	2,11 ± 0,03 (97 %)

*: aus Radioaktivität errechnete Werte

**: Summe der Fettsäuren 16:0, 18:0, 18:1c, 18:1t, 18:2, 20:4 und 22:6

Während die radioaktiv markierten Lipide vollständig extrahiert wurden, nahm die Wiederfindung der extrahierten Phosphatmengen mit zunehmender Hydrolysedauer ab. Ähnliche Unterschiede waren auch bei den Gesamt-Fettsäuren zu verzeichnen: Die extrahierten Anteile der gesättigten Fettsäuren (Palmitin- und Stearinsäure) zeigten einen zum Phosphat analogen Verlauf, die ungesättigten Fettsäuren wurden quantitativ zurückgewonnen. Diese Unterschiede lassen sich mit einer unvollständigen Extraktion von entstandenem Lysophosphatidylcholin erklären.

Während der Phospholipase-Behandlung stieg der Gehalt an freien Fettsäuren schon innerhalb der ersten 10 Minuten stark an. Die während der Inkubation freigesetzten Fettsäuren sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 27:

Fettsäurefreisetzung aus Phosphatidylcholin nach Inkubation mit Phospholipase A_2

Zeit [min]	durch Phospholipase A_2 freigesetzte FS [Summe Mol FS/Mol P]	Zusammensetzung der freigesetzten Fettsäuren [Mol FS / Mol P]						
		16:0	18:0	18:1c	18:1t	18:2	20:4	22:6
10	0,85	0,002	0,000	0,050	0,014	0,293	0,432	0,058
20	0,85	0,005	0,000	0,048	0,014	0,293	0,431	0,053
40	0,94	0,017	0,001	0,063	0,016	0,307	0,466	0,067
80	0,98	0,040	0,010	0,059	0,018	0,313	0,467	0,067
veresterte Fettsäuren vor Versuchsbeginn		0,518	0,486	0,030	0,041	0,317	0,482	0,063

(aufgeführte Werte nach Subtraktion der schon zu Beginn der Inkubation frei vorliegenden Fettsäuren)

Die ungesättigten Fettsäuren wurden bis auf die trans-Vaccensäure, $C_{18:1\ (11t)}$, nach 80 Minuten nahezu vollständig abgespalten. Die trans-Vaccensäure wurde zu ca. 50 Prozent freigesetzt, während bei den gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) am Ende der Inkubation nur acht bzw. zwei Prozent der ursprünglich gebundenen Menge als freie Fettsäuren vorlagen. Demnach waren die gesättigten Fettsäuren tatsächlich zum größten Teil an Position sn-1, die ungesättigten Fettsäuren an Position sn-2 des Phosphatidylcholins verestert, während trans-Vaccensäure offensichtlich in beiden Positionen vorkam.

Aliquote Anteile der zu den verschiedenen Zeitpunkten der Hydrolyse extrahierten Lipide wurden dünnschichtchromatographisch getrennt. Die Lysophosphatidylcholin-, Phosphatidylcholin- und Fettsäure-haltigen Zonen wurden durch Anfärben mit Rhodamin B lokalisiert, von der Platte abgekratzt, und im eluierten Lipid (siehe 2.5.2.1.4.) die Radioaktivität und der Gehalt an Phosphat bestimmt. Vorversuche mit Heptadecanoyl-Lysophosphatidylcholin und 1-Palmitoyl-2-oleyl-phosphatidylcholin hatten gezeigt, daß zwischen 89 und 96 Prozent dieser Phospholipide aus dem Kieselgel der Dünnschichtplatten zurückgewonnen werden konnten.

Die relativen Phosphatmengen, die nach Dünnschichtchromatographie im Phosphatidylcholin gefunden wurden, sind in Abbidung 60 graphisch dargestellt.

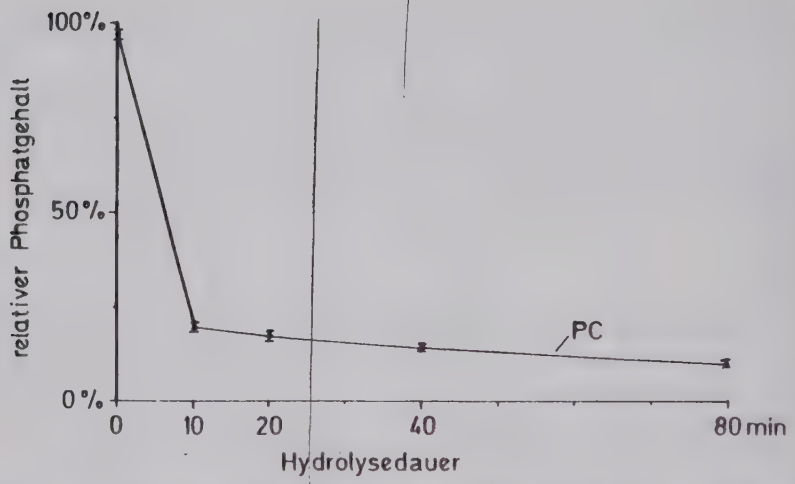


Abb. 60: Phospholipase-A_2-Spaltung von Phosphatidylcholin (PC) nach kovalenter Bindung von $^{14}CCl_4$-Metaboliten. Aufgetragen ist der relative Phosphatgehalt in nicht hydrolysiertem PC nach dünnschichtchromatographischer Trennung, bezogen auf den Gesamtgehalt an Phosphat in den getrennten PC- und LPC-Fraktionen.

Offenbar verlief die Phospholipidspaltung nicht so vollständig, wie aus der Bestimmung der Fettsäurefreisetzung geschlossen wurde, erreichte jedoch nach 80 Minuten 91 Prozent. Im Gegensatz dazu war die Hydrolyse von Phosphatidylcholin, das durch kovalente Bindung reaktiver CCl_4-Metaboliten modifiziert war, wesentlich unvollständiger, wie aus dem Verhältnis der Radioaktivität in den dünnschichtchromatographisch getrennten Zonen von Lysophosphatidylcholin, Phosphatidylcholin und freien Fettsäuren hervorgeht (siehe Abbildung 61).

Nach 10 Minuten enthielt die Phosphatidylcholin-Fraktion 62 Prozent, nach 80 Minuten noch 47 Prozent der aus den drei Zonen eluierten Gesamtmenge an Radioaktivität. Das entstandene Lysophosphatidylcholin enthielt etwa viermal weniger an gebundenen CCl_4-Metaboliten als die abgespaltenen Fettsäuren.

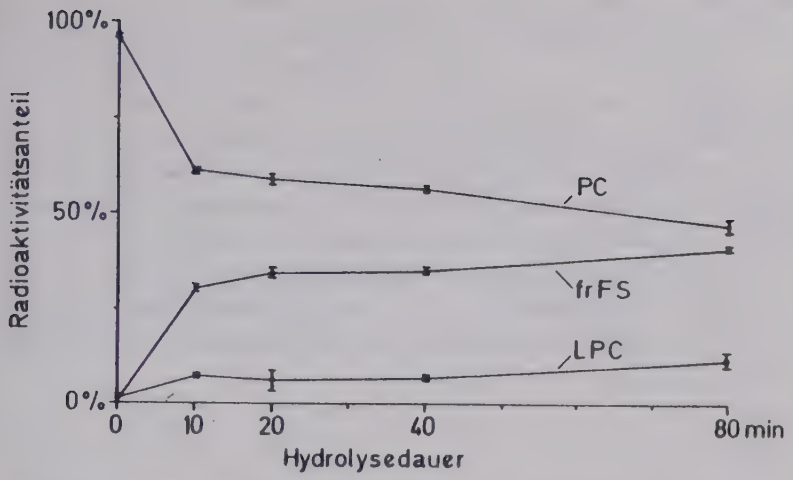


Abb. 61: Phosphalipase-A_2-Spaltung von Phosphatidylcholin nach kovalenter Bindung von $^{14}CCl_4$-Metaboliten. Dargestellt ist die prozentuale Radioaktivität in nicht hydrolysiertem Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC) und abgespaltenen Fettsäuren (fr. FS) nach dünnschichtchromatographischer Trennung, bezogen auf den Gesamtradioaktivitätsgehalt in den getrennten Lipidfraktionen (PC + LPC + fr.FS)

Wegen der geringeren Hydrolyserate des kovalent modifizierten Phosphatidylcholins nahm das Verhältnis von kovalent gebundenen CCl_4-Metaboliten zum Phosphatgehalt in der Phosphatidylcholin-Fraktion mit Fortschreiten der enzymatischen Reaktion von 3,1 Mol-Prozent (0 Minuten) auf 15,3 Mol-Prozent (80 Minuten) zu (siehe Abbildung 62). In der Lysophosphatidylcholin-Fraktion betrug dieses Verhältnis auch nach 80 Minuten weniger als 0,4 Mol-Prozent.

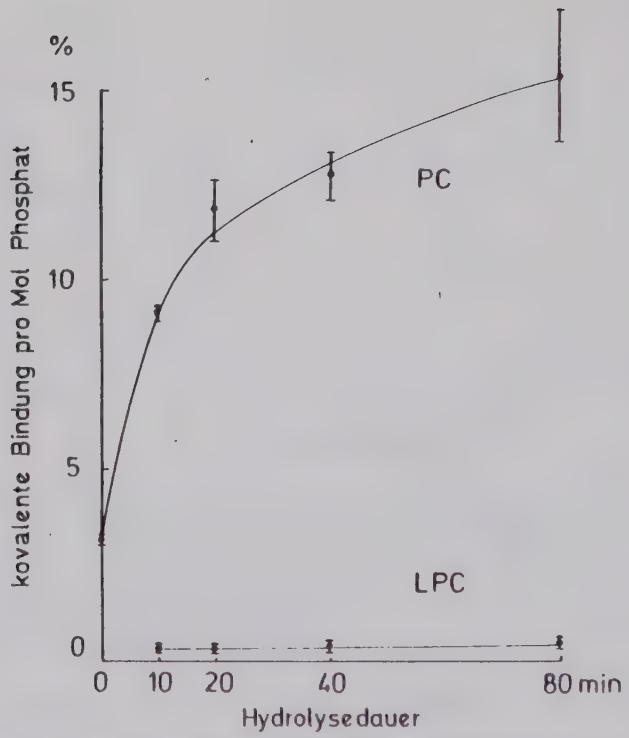


Abb. 62: Phospholipase-A_2-Spaltung von Phosphatidylcholin nach kovalenter Bindung von $^{14}CCl_4$-Metaboliten.
Prozentualer Anteil der kovalenten Bindung (in Mol gebundener CCl_4-Metaboliten pro 100 Mol Phosphat) im nicht hydrolysierten Phosphatidylcholin (PC) bzw. im gebildeten Lysophosphatidylcholin (LPC) nach dünnschichtchromatographischer Trennung

Bei der aus dem Gift der Schlange Naja naja stammenden Phospholipase A_2 handelt es sich wie bei derjenigen aus Schweinepankreas um ein relativ kleines, hitzestabiles Enzym, das zur enzymatischen Aktivität Ca^{2+}-Ionen benötigt. Schlangengift- und Pankreas-Phospholipasen unterscheiden sich jedoch bezüglich ihres isoelektrischen Punkts, ihres pH- und Temperatur-Optimums und wahrscheinlich auch im Reaktionsmechanismus (#19;#181). Mit beiden Enzymen konnten jeweils nur ca. 50 Prozent des Phosphatidylcholins,

das durch kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten modifiziert war, hydrolysiert werden; Spezifitätsunterschiede der Phospholipasen machten sich im Hydrolysegrad nicht bemerkbar.

Die kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten muß daher zu einer grundlegenden Veränderung bei einem Teil der modifizierten Phosphatidylcholin-Moleküle geführt haben. Eine Modifikation im Glycerinphosphat-Teil des Phospholipids kann ausgeschlossen werden, da die Radioaktivität nach Umesterung mit Methanol mit n-Hexan extrahiert werden konnte. Da das entstandene α-Lysophosphatidylcholin keine nennenswerte radioaktive Markierung trug, müssen in erster Linie die ungesättigten Fettsäuren in Position sn-2 des Phospholipids von der Modifikation betroffen sein.

4. Schlußfolgerungen

4.1. Zur Lipidperoxidations-Hypothese

Der Schädigungsprozeß, der durch Tetrachlormethan ausgelöst wird, kann in drei Phasen eingeteilt werden:

Phase 1: Aktivierung von Tetrachlormethan durch reduktive Metabolisierung zum CCl_3-Radikal an Cytochrom P-450,

Phase 2: durch CCl_3-Radikale ausgelöste Sekundärreaktionen, die zur Modifizierung von Biomolekülen führen,

Phase 3: durch diese modifizierten Biomoleküle ausgelöste Folgeprozesse, die schließlich zum pathologisch faßbaren Zellschaden führen.

Beim Konzept der sogenannten Lipidperoxidation wird als wesentlicher Mechanismus der zweiten Phase die radikalisch initiierte Bildung von Fettsäurehydroperoxiden postuliert. Diese Hydroperoxide oder ihre Zerfallsprodukte sollen dabei als Bindeglieder zwischen dem initialen Prozeß (Phase 1), der wegen der kurzen Lebensdauer der CCl_3-Radikale auf die unmittelbare Umgebung des Cytochroms beschränkt bleibt, und den an anderen Orten in der Zelle auftretenden Folgeschäden fungieren.

Auch für die Hämolyse von Erythrozyten bei gemeinsamer Inkubation mit peroxidierten Mikrosomen wurde gemäß diesem Konzept eine direkte Beteiligung von Fettsäurehydroperoxiden diskutiert. Die hämolytische Wirkung von Fettsäurehydroperoxiden oder ihren Zerfallsprodukten muß nach den hier vorgelegten Untersuchungen aber als relativ gering eingeschätzt werden. Die Hämolyse dürfte eher auf die Wirkung von Lysophosphatiden, die bei der Peroxidation von Mikrosomen gebildet werden, zurückzuführen sein. Die Entstehung dieser Lysophosphatide läßt sich damit erklären, daß Hydroperoxid-haltige Phospholipide durch Phospholipasen rasch gespalten werden (#156).

Fettsäurehydroperoxide können nach unseren Untersuchungen jedoch für die Zerstörung von Cytochrom P-450, die bei der mikrosomalen Lipidperoxidation beobachtet wird, verantwortlich sein; Zerfallsprodukte der Hydroperoxide spielen bei diesem Prozeß offenbar keine Rolle. Allerdings dürfte bei der durch Eisenionen ausgelösten Lipidperoxidation der größte Teil der intermediär gebildeten Fettsäurehydroperoxide durch Reaktion mit den zugesetzten Eisenionen zerfallen.

Die Rolle von Fettsäurehydroperoxiden bzw. ihren Zerfallsprodukten als zentrale Vermittlerstoffe ("second messengers") bei der toxischen Wirkung von Tetrachlormethan ist inzwischen von Recknagel einer eingehenden Kritik

unterzogen worden (#135;#136). Ein wesentlicher Aspekt stellt dabei die Konzentration freier Eisenionen in Mikrosomen dar. In der Regel enthalten die Inkubationsansätze bei in-vitro-Versuchen zur Lipidperoxidation eine mehr oder weniger exakt definierte Konzentration von Eisenionen in Form von $FeSO_4$, als Fe^{2+}-ADP-Komplex oder als Verunreinigung im Phosphatpuffer. Werden durch Zusatz von EDTA die Eisenionen komplexiert, kann mit NADPH allein keine Lipidperoxidation mehr ausgelöst werden; die Addition von Tetrachlormethan führt hier zu einem wesentlich geringeren Verlust an polyungesättigten Fettsäuren als bei Anwesenheit freier Eisenionen (#81). Diese starke Hemmung peroxidativer Schädigungsprozesse in vitro durch EDTA - trotz Anwesenheit von Tetrachlormethan - wurde auch von anderen Autoren beobachtet (#13;#158); die Metabolisierung von Tetrachlormethan wird durch EDTA jedoch nicht gehemmt (#153). Demnach ist die Metabolisierung von Tetrachlormethan nicht zwangsläufig mit peroxidativen Schädigungsprozessen gekoppelt; nach Wolf et al. (#198) sollen beide Prozesse sogar zwei völlig voneinander unabhängige Vorgänge sein.

Weiter ist fraglich, ob für die Zerstörung von Cytochrom P-450 bei der Eisen-freien Inkubation von Mikrosomen mit Tetrachlormethan Fettsäurehydroperoxide, die dabei nur in begrenzten Mengen gebildet werden, verantwortlich sind; inzwischen ist jedenfalls zweifelsfrei nachgewiesen worden, daß die CCl_4-Metabolisierung selbst bei Abwesenheit von Sauerstoff zur Zerstörung des Cytochroms führt (#31;#93;#199).

In vivo wird die Konzentration an freiem Eisen in den Zellen, speziell in der Leber, durch eisenbindende Proteine wie Ferritin und Hämosiderin extrem niedrig gehalten. Selbst bei einem Gesamteisengehalt in der Leber, der gegenüber dem Normalwert um das 200-fache erhöht war, konnte in Rattenlebermikrosomen keine Lipidperoxidation festgestellt werden (#7). Leberzellen verfügen demnach über recht wirksame Schutzmechanismen zur Vernütung peroxidativer Schädigungsprozesse.

Neben eisenbindenden Proteinen spielt hier wohl auch die GSH-Peroxidase eine Rolle, die als cytosolisches Enzym in isolierten Mikrosomen nicht mehr enthalten ist. Dieses Enzym katalysiert mit Hilfe von Glutathion (GSH) die Umwandlung von Fettsäurehydroperoxiden in Hydroxyfettsäuren und hemmt damit durch Hydroperoxide ausgelöste Schädigungsprozesse (#48;#110;#165):

$$ROOH + 2\ GSH \xrightarrow{\text{GSH-Peroxidase}} ROH + GSSG + H_2O$$

Möglicherweise sind an dieser Reaktion auch andere GSH-abhängige, cytosolische Enzyme beteiligt (#96). Da der hepatische GSH-Spiegel bei Ratten durch CCl_4-Behandlung nicht oder nur minimal beeinflußt wird (#37;#99;#124), ist es unwahrscheinlich, daß bei der CCl_4-Metabolisierung intermediär größere Mengen an Fettsäurehydroperoxiden gebildet werden.

Ein weiteres Argument, das gegen die Lipidperoxidations-Hypothese spricht, ergibt sich aus dem steilen Sauerstoffgradienten in den Leberläppchen, wodurch im zentrilobulären Bereich der Sauerstoffpartialdruck auf wenige Torr absinkt. Obwohl in diesen Leberarealen das Sauerstoff-Optimum für die Lipidperoxidation weit unterschritten ist, treten nach CCl_4-Intoxikation dort die ersten Zellnekrosen auf (siehe 1.3.; Seite 13). Es ist daher fraglich, ob die in vivo nach CCl_4-Intoxikation im Leberhomogenat von Mäusen nachgewiesenen Fettsäurehydroperoxide (#99) quantitativ von Bedeutung sind. Aus vorläufigen Untersuchungen in unserem Labor läßt sich abschätzen, daß die Konzentration an Fettsäurehydroperoxiden in Lebermikrosomen von Ratten, die in vivo unter hypoxischen Bedingungen mit Tetrachlormethan behandelt wurden und histologisch deutliche Leberschäden aufwiesen, etwa ein Promille im Vergleich zur Konzentration an ungesättigten Fettsäuren betrug.

Das Fe^{2+}/NADPH-Modell der mikrosomalen Lipidperoxidation, auf dem die meisten Untersuchungen basieren, die für eine Beteiligung peroxidativer Prozesse an der Toxizität von Tetrachlormethan sprechen, wird also mindestens in drei wesentlichen Punkten (Konzentration freier Eisenionen, cytosolische Schutzmechanismen, Sauerstoffkonzentration) den Verhältnissen in vivo nicht gerecht. Die oft recht spekulativen Schlußfolgerungen, die aus diesem extrem artifiziellen System für den Mechanismus der durch Tetrachlormethan ausgelösten Schädigungsprozesse abgeleitet werden, müssen daher kritisch betrachtet werden.

4.2. Modell der anaeroben Tetrachlormethan-Metabolisierung

Die Metabolisierung von Tetrachlormethan läßt sich in vitro durch anaerobe Inkubation von Mikrosomen stark stimulieren (#138;#175). Der Grund dafür besteht darin, daß Sauerstoff mit Tetrachlormethan um die gleiche Bindungsstelle am Cytochrom P-450 konkurriert (#175); durch eine Absenkung der Sauerstoff-Konzentration wird die Hemmung der CCl_4-Metabolisierung aufgehoben. Da - wie oben erwähnt - durch Tetrachlormethan verursachte Zellnekrosen in den offensichtlich stark hypoxischen zentrilobulären Arealen der Leber zuerst auftreten und die Hepatotoxizität von Tetrachlormethan in vivo durch Hypoxie stark gesteigert wird (#38;#164), erscheint es gerechtfertigt, die anaerobe Metabolisierung von Tetrachlormethan in Rattenlebermikrosomen als Modell für die Untersuchung der CCl_4-Toxizität heranzuziehen.

Aus den Arbeiten, die bisher dazu erschienen sind, ergeben sich die in Tabelle 28 aufgeführten quantitativen Verhältnisse für die anaerobe CCl_4-Metabolisierung in vitro:

Tabelle 28:
Anaerobe Metabolisierung von Tetrachlormethan in Lebermikrosomen
Zusammenstellung der aus der Literatur ermittelten Daten
(Einheiten, soweit nicht anders angegeben, in nMol/mg Protein pro Minute)

Literaturstelle	CCl_4-Konz.	CCl_4-Metabol.	$CHCl_3$-Bildung	CO-Bildung	irrevers. Bindung Lipide	irrevers. Bindung Proteine
#55 (Ratten)	ca. 0,1 mM	2* 100 %	0,7* 34 %		40-45 %	9 %
#1 (Ratten)	1,0 mM		1,5	0,24	1,1	0,24
#175(Kaninchen)	1,0 mM		2,2**			0,7**
#93 (Ratten)	0,5 mM	4* 100 %	1,3* 31 %			

* extrapolierte Initialgeschwindigkeit

** berechnet aus den Werten nach 5 Minuten

Diese Angaben sind mit den von uns ermittelten Daten durchaus vergleichbar; die $CHCl_3$-Bildung betrug in unseren Experimenten zwischen 33 und 40 Prozent, die irreversible Lipidbindung zwischen 30 und 50 Prozent der metabolisierten CCl_4-Menge (siehe 3.4.2. bzw. 3.5.1.). Eine starke irreversible Lipidbindung gilt als Kriterium für toxische Chemikalien, die bei der Metabolisierung freie Radikale bilden (#99). Die kovalente Lipidbindung von CCl_4-Metaboliten ist nur für die anaerobe Metabolisierung charakteristisch; unter Normalatmosphäre ist sie im Gegensatz zur irreversiblen Proteinbindung kaum mehr nachweisbar (#78).

Auch in vivo ist die kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten an mikrosomale Lipide der Leber deutlich ausgeprägt (#34;#140). Dies legt wegen der starken Sauerstoff-Abhängigkeit der irreversiblen Lipidbindung ebenfalls die Vermutung nahe, daß die CCl_4-Metabolisierung in der Rattenleber unter hypoxischen Bedingungen abläuft. Aus der Analyse der kovalent modifizierten Lipide geht hervor, daß die in vivo auftretende kovalente Lipidbindung mindestens qualitativ mit dem in-vitro-Modell der anaeroben mikrosomalen CCl_4-Metabolisierung recht gut beschrieben werden kann; so ergab die Massenfragmentographie der veresterten Lipide, die nach anaerober in-vitro-Metabolisierung von Tetrachlormethan isoliert wurden, bei der GC/MS-Analyse mit negativer chemischer Ionisation für chlorhaltige Verbindungen ein nahezu identisches Peakmuster wie bei den nach in-vivo-Behandlung von Ratten mit Tetrachlormethan aus Lebermikrosomen isolierten Lipiden (siehe 3.5.5.2.). Eine Übereinstimmung im Peakmuster der Methylesterderivate der Lipide, die nach anaerober in-vitro-Metabolisierung bzw. nach in-vivo-Metabolisierung von Tetrachlormethan aus Mikrosomen isoliert wurden, konnten auch Benedetti et al. (#12;#13) in den Gaschromatogrammen unter Verwendung eines Elektroneneinfang-Detektors zeigen. Das Peakmuster der Methylesterderivate, die sie aus aeroben in-vitro-Versuchen mit Tetrachlormethan erhielten, unterschied sich davon völlig und war nicht auf chlorhaltige Verbindungen zurückzuführen, da daselbe Muster auch bei Abwesenheit von Tetrachlormethan entstand. Eine Identifizierung der gefundenen Produkte gelang den Autoren jedoch nicht, da sie gepackte Säulen mit wesentlich geringeren Trennleistungen verwendeten.

4.3. Mechanismus der kovalenten Bindung von Tetrachlormethan-Metaboliten

Trichlormethylradikale, die bei der Metabolisierung von Tetrachlormethan am Cytochrom P-450 gebildet werden, können nach unseren Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen offenbar zwei prinzipiell unterschiedliche Reaktionen eingehen (siehe Abbildung 63):

- Abstraktion von Wasserstoff aus polyungesättigten Fettsäuren oder anderen endogenen Wasserstoffdonatoren wie Vitamin E unter Bildung von Trichlormethan,
- Addition des Trichlormethylradikals an eine Fettsäure-Doppelbindung unter Ausbildung eines Trichlormethylfettsäure-Radikals, das durch Aufnahme eines Wasserstoffatoms unter Verlust der Doppelbindung in die stabile Trichlormethylfettsäure-Verbindung übergeht.

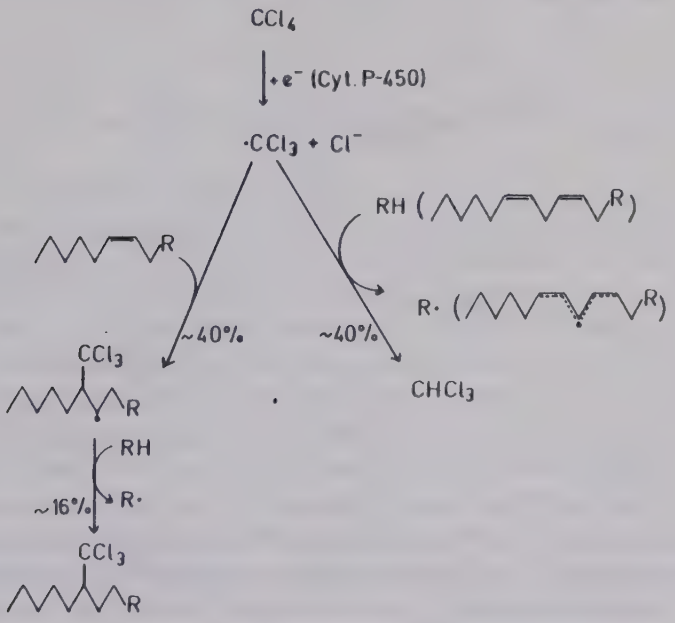


Abb. 63: Reaktionen des Trichlormethyl-Radikals in Mikrosomen

Aus dem Verhältnis zwischen $CHCl_3$-Bildung und irreversibler Lipidbindung geht hervor, daß beide Reaktionsmöglichkeiten in vergleichbarem Ausmaß verwirklicht sind (siehe auch Tabelle 28). Neben Fettsäure-Doppelbindungen kommen für die Addition von Trichlormethyl-Radikalen auch Doppelbindungen im Cholesterin und Sphingosin in Betracht. Die über GC/MS identifizierten Trichlormethylfettsäure-Verbindungen repräsentieren ca. 40 Prozent der irreversiblen Lipidbindung und damit etwa 16 Prozent der metabolisch gebildeten Trichlormethylradikale.

Die radikalische Addition von Polyhalogenmethanen an Olefine ist in der organischen Chemie eine gängige Reaktion. So reagiert Octen-1 mit einem Überschuß von Tetrachlormethan in Gegenwart von Benzoylperoxid oder ultraviolettem Licht als Radikalstarter mit guten Ausbeuten zum 1,1,1,3-Tetrachlornonan, mit Trichlormethan entsprechend zum 1,1,1-Trichlornonan (#77; siehe Abb. 64):

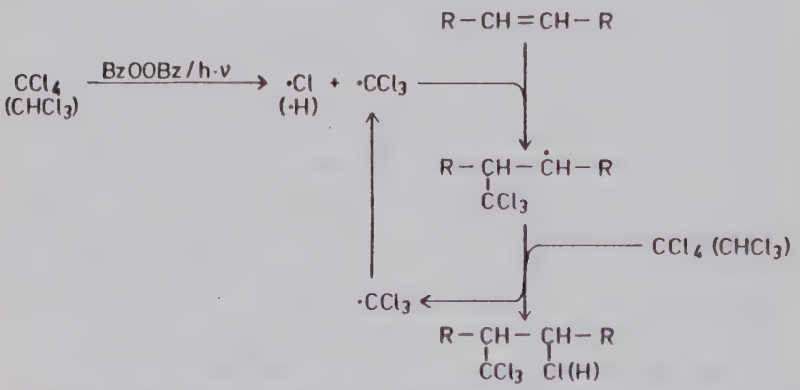


Abb. 64: Radikalische Addition von CCl_4 (bzw. $CHCl_3$) an Olefine

Bei einem Überschuß der Olefine wird statt der Addition der Halogenmethane jedoch die Polymerisation der Olefine favorisiert (Abb. 65). Bei entsprechender Konzentration können Halogenmethane als Kettenüberträger fungieren und werden zu diesem Zweck zur Telomerisation von Olefinen eingesetzt (#16).

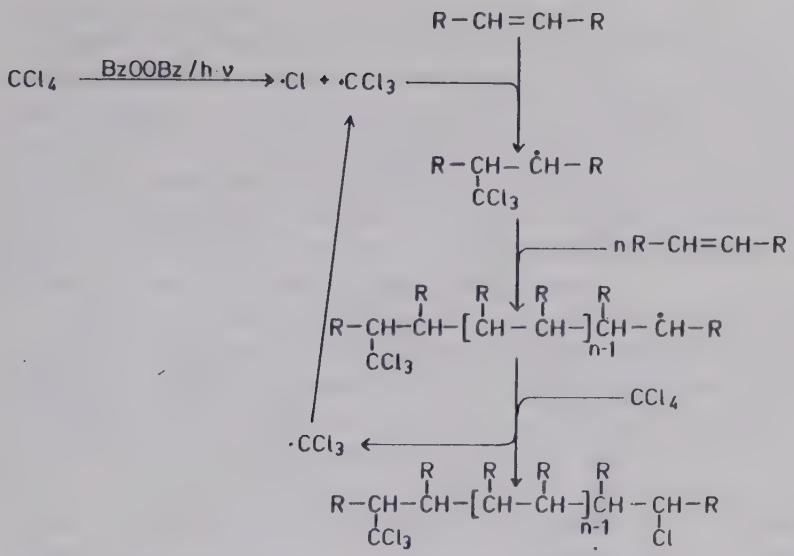


Abb. 65: radikalische Polymerisation von Olefinen

Die Phospholipide des endoplasmatischen Retikulums der Leberzellen zeichnen sich durch ihren hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aus; in den Mikrosomen, die für unsere Versuche eingesetzt wurden, enthielt ungefähr jede zweite Fettsäure eine oder mehrere Doppelbindungen. Bei der Addition von Trichlormethyl-Radikalen an diese Fettsäuren sind daher auch Polymerisationsprodukte zu erwarten, sofern die Kettenreaktion nicht durch geeignete Inhibitoren schnell abgebrochen wird (siehe Abb. 66). Als Inhibitoren könnten neben Vitamin E polyungesättigte Fettsäuren selbst fungieren, da sie durch Abgabe eines Wasserstoffatoms in die mesomeriestabilisierten und damit reaktionsträgeren Fettsäure-Radikale mit Pentadienylstruktur übergehen können. Molekularer Sauerstoff, der mit Radikalen relativ reaktionsträge Peroxy-Radikale bildet, könnte ebenfalls einen Kettenabbruch hervorrufen.

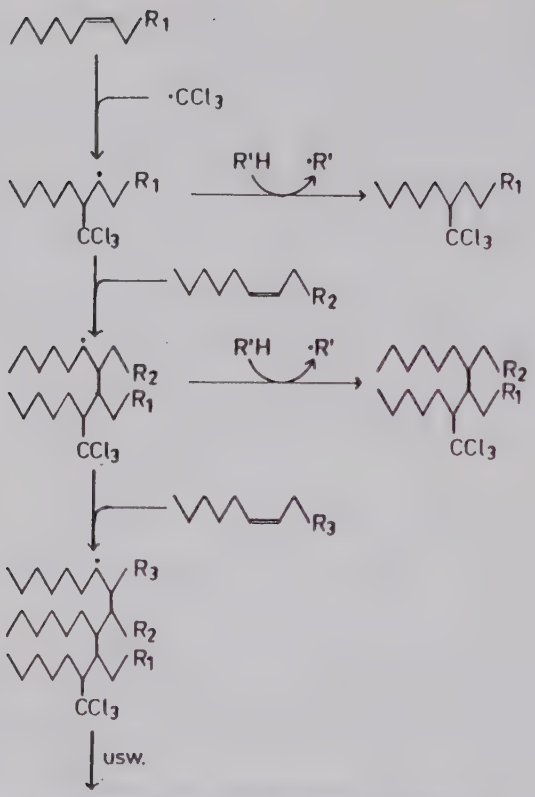


Abb. 66: Postulierter Mechanismus für die Bildung von Fettsäure-Vernetzungsprodukten

Für die Bildung von oligomeren Fettsäureverbindungen bei der anaeroben Metabolisierung von Tetrachlormethan gibt es aus unseren Untersuchungen mehrere Hinweise:

- Nach der Veresterung der isolierten Lipide konnten die kovalent modifizierten Verbindungen nahezu quantitativ mit Hexan extraktiert werden, gaschromatographisch ließen sich im Hexanextrakt jedoch nur 40 Prozent der modifizierten Verbindungen als Trichlormethylfettsäuremethylester nachweisen. Bei der Bildung von trichlormethylierten Fettsäure-Oligomeren ließe sich dieses Verhalten erklären, da solche Verbindungen zwar in Hexan gut löslich, wegen ihrer geringen Flüchtigkeit aber nicht mehr gaschroma-

tographisch nachweisbar sein sollten.

- Sowohl bei der Dünnschicht- als auch bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie wiesen jeweils nur 40 Prozent der veresterten, kovalent modifizierten Lipide ähnliche chromatographische Eigenschaften wie die "normalen" Fettsäuremethylester auf. Bei der Dünnschichtchromatographie entfiel der restliche Anteil auf mehrere Fraktionen mit polarerem Charakter (geringere R_f-Werte), bei der HPLC dagegen auf eine Lipidfraktion, die erst mit dem stark unpolaren Lösungsmittel Hexan von der ebenfalls unpolaren stationären RP-18-Phase eluiert werden konnte.

Für oligomere Fettsäure-Verbindungen ließe sich dieses zunächst widersprüchlich erscheinende chromatographische Verhalten damit erklären, daß sie wegen ihrer größeren Anzahl von Carboxylgruppen pro Molekül bei der Dünnschichtchromatographie stärker an das Kieselgel gebunden werden, bei der HPLC dagegen wegen ihres höheren Anteils lipophiler Fettsäurereste pro Molekül von der lipophilen stationären Phase stärker zurückgehalten werden. Bei den einzelnen Fraktionen, die durch Dünnschichtchromatographie getrennt wurden (siehe Abb. 40; Seite 127), könnte es sich damit möglicherweise um Dimere (Fraktion 4), Trimere (Fraktion 3), Tetramere (Fraktion 2) und noch höher vernetzte Fettsäuremethylester (Fraktion 1) handeln

- Die Bildung von Vernetzungsprodukten zwischen ungesättigten Fettsäuren benachbarter Phospholipide liefert auch eine plausible Erklärung für die partielle Resistenz von kovalent modifiziertem Phosphatidylcholin bei enzymatischer Hydrolyse mit Phospholipase A_2.

Für ähnliche oligomere Verbindungen, nämlich oligomere Acylglyceride aus oxidierten Pflanzenölen, ist eine Hemmung der enzymatischen Hydrolyse kürzlich nachgewiesen worden (#200;#201). Im Gegensatz dazu werden Fettsäurehydroperoxid-haltige Phospholipide von Phospholipasen rasch gespalten (#156). Da sich nach 80-minütiger Inkubation im nicht hydrolysierten Phosphatidylcholin ein Verhältnis von 15 Prozent kovalent gebundener CCl_4-Metaboliten pro Mol Phosphat ergab, dürfte der mittlere Vernetzungsgrad bei ca. sechs Molekülen pro angelagertem Trichlormethylrest liegen.

Möglicherweise spielen Fettsäureradikale mit Pentadienylstruktur, die durch Abstraktion von Wasserstoff aus polyungesättigten Fettsäuren entstehen, aufgrund ihrer höheren Lebensdauer bei der Termination der Fettsäurevernetzung eine Rolle. Wie aus Abbildung 67 hervorgeht, entstehen dabei Oligomere mit einer konjugierten Doppelbindung. Dies könnte die hohe UV-Absorption der kovalent modifizierten Lipide erklären, die Benedetti

et al. (#12) in den "polaren" Fraktionen bei der dünnschichtchromatographischen Trennung der Fettsäuremethylester fanden (siehe 3.5.4.1.).

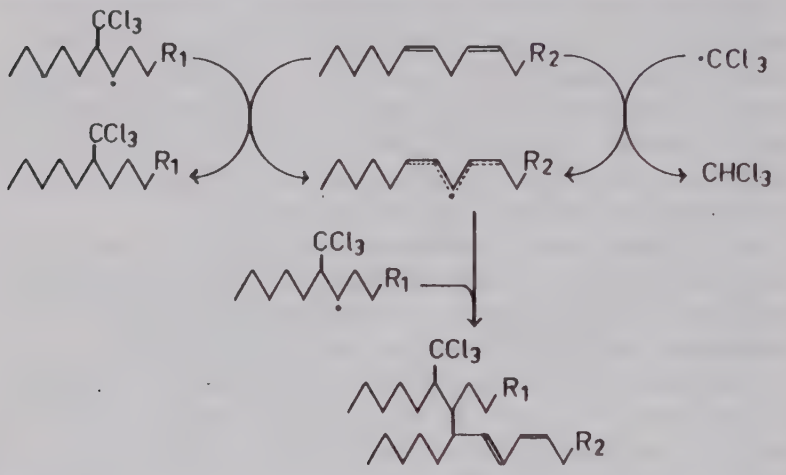


Abb. 67: Postulierte Reaktion von Trichlormethylfettsäure-Radikalen mit polyungesättigten Fettsäuren

Die erhöhte Dienkonjugation, die in Leberlipiden nach CCl_4-Behandlung in vivo festgestellt wurde (#132), ist damit nicht als sicherer Beweis für eine Lipidperoxidation zu werten; dies gilt ebenso für die Bildung von Ethan und Pentan, die auch durch ß-Spaltung aus den Trichlormethylfettsäure-Radikalen entstehen können (siehe Abb. 38, Seite 120).

Ein direkter Beweis für die Bildung von vernetzten Lipiden als Folge der CCl_4-Metabolisierung steht bisher noch aus. Wegen der geringen Flüchtigkeit dieser Verbindungen sind GC/MS-Methoden zur Analyse nur beschränkt anwendbar. Zur Isolierung und Molekulargewichtsbestimmung könnte eventuell die Gelpermeations-Chromatographie an Polystyrolen oder die Ultrafiltration unter Verwendung geeigneter Membranen eingesetzt werden. Als Detektionsmethode zum Nachweis nichtflüchtiger chlorhaltiger Verbindungen scheint die Photodissoziation erfolgversprechend.

4.4. Bedeutung kovalent modifizierter Lipide für die Toxizität von Tetrachlormethan

Mit dem Nachweis enzymatisch schwer spaltbarer Additionsverbindungen zwischen CCl_4-Metaboliten und Phospholipiden wurde erstmals gezeigt, daß sich durch CCl_4-Metaboliten kovalent modifizierte Lipide biochemisch anders als die "normalen" Lipide verhalten. Diese veränderten biochemischen Eigenschaften könnten für den Mechanismus der CCl_4-Toxizität von grundlegender Bedeutung sein.

Intrazelluläre Phospholipasen sind inzwischen in verschiedenen Zellkompartimenten nachgewiesen worden, wobei sich sowohl die Eigenschaften der Phospholipasen, z.B. pH-Optimum und Ca^{2+}-Abhängigkeit, als auch das Verhältnis zwischen Phospholipase A_1 und Phospholipase A_2 in den einzelnen Zellkompartimenten unterscheiden (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29:
Intrazelluläre Lokalisation von Phospholipasen in der Rattenleber (nach van den Bosch, #179)

Subzelluläre Fraktion	Hauptaktivität	pH-Optimum	Ca^{2+}-Stimulierbarkeit
Plasmamembran	$A_1 + A_2$	8,0 - 9,5	+
Mikrosomen	$A_1 \gg A_2$	8,0 - 9,5	+
Golgi-Membran	$A_1 + A_2$	8,0	+
Mitochondrien	A_2	8,0 - 9,0	+
Cytosol	$A_1 + A_2$	7,4	?
	A_1	3,6	-
Lysosomen	$A_1 + A_2$	4,0 - 5,0	-

Während die sauren Phospholipasen, die vor allem in den Lysosomen vorkommen - eventuell handelt es sich bei der im Cytosol nachgewiesenen sauren Phospholipase um lysosomale Verunreinigungen - vor allem für den Abbau von Phospholipiden eine Rolle spielen, scheinen die alkalischen, Ca^{2+}-abhängigen Phospholipasen eher für die Regulation der Membraneigenschaften in den einzelnen Zellorganellen von Bedeutung zu sein. Im Zusammenspiel mit Lysophospholipid-Acyl-Transferasen sorgen sie für einen hohen Turnover der Phospholipide, was möglicherweise als Reparaturmechanismus wichtig ist; gleichzeitig kann durch den Deacylierungs-Reacylierungs-Prozeß die für die jeweilige Zellorganelle spezifische Fettsäurezusammensetzung der Phospho-

lipidmembran eingestellt werden (#179). Kovalent modifizierte, Phospholipase-resistente Phospholipide würden jedoch nicht mehr ohne weiteres aus den Membranlipiden entfernt werden und könnten dadurch zu einer Störung des dynamischen Gleichgewichts der Phospholipid-Biosynthese führen. Dabei ist speziell auch an eine Senkung der Membranfluidität durch den hohen Vernetzungsgrad solcher Phospholipide zu denken, die zu einer Veränderung der Membraneigenschaften führen kann.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß die Enzyme für die Phospholipid- und Triglycerid-Biosynthese zum größten Teil im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (Übersichtsliteratur siehe #10 und #178). Abbildung 68 zeigt die Synthesewege der verschiedenen Phospholipide mit den daran beteiligten Enzymen und ihre intrazelluläre Lokalisation.

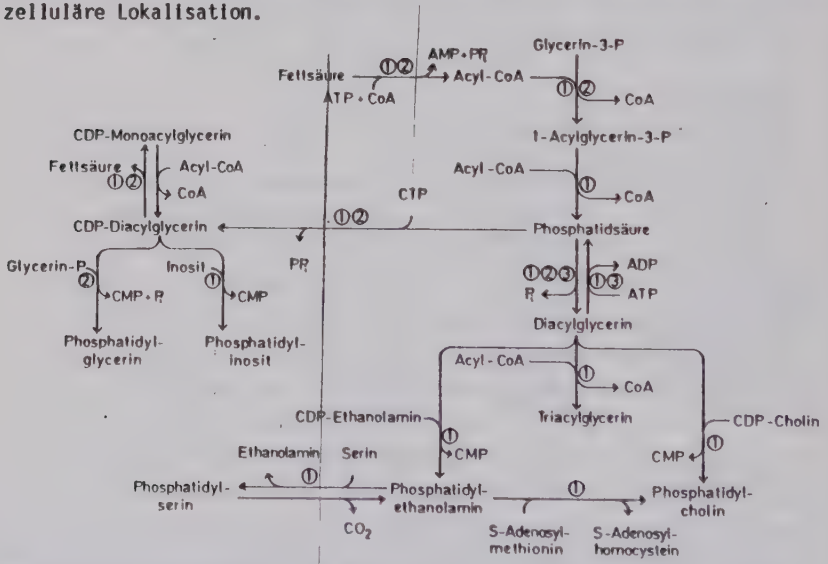


Abb. 68: Biosynthesewege von Phospholipiden in der Rattenleber, nach Bell & Coleman (#10).
Intrazelluläre Lokalisation der beteiligten Enzyme:
① : endoplasmatisches Retikulum
② : Mitochondrien
③ : Cytosol

Bezüglich ihrer Phospholipide sind daher alle Zellorganellen von der Syntheseleistung des endoplasmatischen Retikulums abhängig; lediglich in den Mitochondrien ist die Synthese einiger spezieller Phospholipide möglich, z.B. CDP-Diglycerid-Synthese-Weg und Decarboxylierung von Phosphatidylserin (#180), wobei Vorstufen dieser Lipide auch aus dem endoplasmatischen Retikulum stammen. Ebenso erfolgt auch die Synthese der ungesättigten Fettsäuren (Elongations- und Desaturierungs-Reaktionen) an mikrosomalen Enzymen. Beim Transport der nötigen Phospholipide vom endoplasmatischen Retikulum zu den einzelnen Zellorganellen, die über spezifische Phospholipid-Austausch-Proteine bzw. über Vesikel-Abschnürung und Vesikel-Transport unter Beteiligung des Golgi-Apparats zustande kommt (#102), könnten auch die "falschen", kovalent modifizierten Phospholipide in andere Zellorganellen gelangen und dort zur Membranschädigung führen. Interessanterweise stimmt die zeitliche Reihenfolge, in der nach CCl_4-Inkorporation Schäden an den Mitochondrien und an der Plasmamembran eintreten, mit der Zeitdauer überein, die für den Transport von Phospholipiden vom endoplasmatischen Retikulum in diese Zellkompartimente gefunden wurde. So dauert der Transfer von Phospholipiden zu den Mitochondrien etwa zwei bis sechs Stunden (#22); in diesem Zeitraum treten auch die ersten Veränderungen in den Mitochondrien nach CCl_4-Vergiftung auf (siehe 1.2., Seite 4). Bei Puls-Markierungsexperimenten mit $[^3H]$-Glycerin wurde für den Transport von Membranlipiden vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran eine Zeitspanne von mehreren Stunden ermittelt (#102); sogenannte "balloon cells" und lokale, zentrilobuläre Zellnekrosen sind in der Leber etwa sechs bis zwölf Stunden nach der CCl_4-Vergiftung sichtbar.

Wie bereits erwähnt wurde (siehe 1.2.), tritt als frühzeitig nach CCl_4-Intoxikation faßbarer pathologischer Prozeß eine Hemmung der mikrosomalen Ca^{2+}-abhängigen ATPase auf (#100;#101;#117). Diese Hemmung tritt auch unter experimentellen Bedingungen auf, bei der die Lipidperoxidation, gemessen als Malonaldehyd-Bildung, sehr gering (#90) bzw. vollständig unterbunden ist (#184), was die Bedeutung der kovalenten Bindung für diesen Prozeß unterstreicht. Für die sarkoplasmatische Ca^{2+}-abhängige ATPase konnte gezeigt werden, daß ihre Aktivität stark von der Membranfluidität (#154) bzw. von der Fettsäurezusammensetzung der Phospholipidmembran (#169) abhängt. Solche Effekte dürften auch bei der mikrosomalen Ca^{2+}-ATPase vorhanden sein. Kovalent modifizierte, vernetzte Phospholipide können daher durch die Verminderung der Membranfluidität eine wichtige

Rolle bei der Inaktivierung der Ca-ATPase spielen. Falls durch den Transport der modifizierten Phospholipide in andere Membranen, etwa der Mitochondrien- oder Plasmamembran, auch die dort befindlichen Ca-Pumpen beeinträchtigt werden, ließe sich der Mechanismus der CCl_4-Toxizität über einen generellen Zusammenbruch der Calcium-Homöostase erklären, einem Mechanismus, der bei einer ganzen Reihe toxischer Verbindungen als gemeinsamer Endpunkt der verschiedenen Schädigungsprozesse für den Zelltod verantwortlich gemacht wird (#149).

Der Befund, daß die mikrosomale Ca-ATPase auch durch Lipidperoxidation allein - ausgelöst durch Eisenionen und NADPH - ohne die Beteiligung von Tetrachlormethan gehemmt werden kann (#184), braucht nicht im Widerspruch zu der Hypothese zu stehen, daß vernetzte Phospholipide für diesen Prozeß verantwortlich sind: Vernetzungsreaktionen können wie bei allen radikalischen Kettenreaktionen auch bei der peroxidativen Fettsäurezerstörung auftreten und damit den entscheidenden Mechanismus darstellen, ohne daß den niedermolekularen Fettsäure-Zerfallsprodukten eine besondere Bedeutung zugesprochen werden müßte.

Inwiefern andere, durch die CCl_4-Metabolisierung verursachte Störungen des Phospholipidstoffwechsels wie die Hemmung des Cholin-Einbaus in mikrosomale Phospholipide (#59) oder die Hemmung der Phospholipid-Methylierung in der Plasmamembran (#86) durch die kovalente Lipidbindung verursacht werden, läßt sich derzeit nicht sagen. Denkbar wäre unter Umständen eine Störung der ß-Oxidation der Fettsäuren durch die Trichlormethylierung.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, durch in-vitro-Untersuchungen zur Klärung der Frage beizutragen, inwiefern einerseits Fettsäurehydroperoxide, andererseits Produkte aus der kovalenten Bindung von CCl_4-Metaboliten an Lipide für die Toxizität von Tetrachlormethan von Bedeutung sein können. Diese Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die hämolytische Wirkung von 15-Hydroperoxieicosatetraensäure erwies sich im Vergleich zur Arachidonsäure als gering. Bei 98 µM 15-HPETE zeigten Erythrozyten nur eine leichte Steigerung ihrer osmotischen Fragilität, während Arachidonsäure schon in einer Konzentration von 33 µM zur vollständigen Hämolyse der Erythrozyten führte. Deutlich ausgeprägt war dagegen eine durch 15-HPETE hervorgerufene Methämoglobin-Bildung in den Erythrozyten.

2. 15-HPETE bewirkte in Mikrosomen eine starke Hemmung der oxidativen Ethylmorphin-Demethylierung, die im Gegensatz zu Arachidonsäure nicht auf einem kompetitiven Mechanismus beruhte. Mikrosomales Cytochrom P-450, in schwächerem Ausmaß auch Cytochrom b_5, wurde durch 15-HPETE zeit- und konzentrationsabhängig zerstört. Thermische Zersetzungsprodukte der 15-HPETE zeigten eine wesentlich geringere Wirkung.

3. Als Folge der durch Eisenionen und NADPH induzierten Lipidperoxidation kam es in Mikrosomen zu einer Abnahme an Diacylphospholipiden; gleichzeitig nahm der Gehalt an Lysophosphatiden mit einem hohen Anteil gesättigter Fettsäuren zu.

4. Tetrachlormethan wurde in Mikrosomen unter weitgehend anaeroben Bedingungen in Gegenwart von NADPH metabolisiert. Die Metabolisierungsrate zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der CCl_4-Konzentration; unabhängig davon wurde etwa ein Drittel des metabolisierten Tetrachlormethans in Trichlormethan umgewandelt. Die CCl_4-Metabolisierung führte zu einem annähernd äquimolaren Verlust an polyungesättigten Fettsäuren. Obwohl dabei Thiobarbitursäure-reaktive Produkte nur in geringem Ausmaß entstanden, war die relative Bildung von Ethan und Pentan, bezogen auf die Abnahme polyungesättigter Fettsäuren, höher als bei der durch Eisenionen und NADPH ausgelösten Lipidperoxidation.

Cytochrom P-450 wurde auch unter anaeroben Bedingungen als Folge der CCl_4-Metabolisierung zerstört.

5. Unter anaeroben Bedingungen binden zwischen 30 und 50 Prozent der CCl_4-Metaboliten kovalent an mikrosomale Lipide. Nach Umesterung mit Methanol konnten ungefähr 40 Prozent der modifizierten Lipide durch GC/MS nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich zum größten Teil um Methylester-Verbindungen verschiedener Isomere der Trichlormethyl-Eicosatriensäure und der Trichlormethyl-Octadecensäure. Ihre Entstehung läßt sich durch Addition von CCl_3-Radikalen an Fettsäuren unter Verlust einer Doppelbindung erklären.

6. Nur etwa die Hälfte des Phosphatidylcholins, das durch kovalente Bindung von CCl_4-Metaboliten modifiziert war, ließ sich durch Phospholipase A_2 spalten.
   Der Mechanismus der kovalenten Bindung legt die Entstehung von Vernetzungsprodukten zwischen Fettsäuren der Membranlipide als Folge der CCl_3-Addition nahe, womit sich ihre partielle Resistenz gegenüber enzymatischer Spaltung plausibel erklären läßt. Durch Vernetzungsreaktionen hervorgerufene Strukturveränderungen in der mikrosomalen Lipidmembran kommen als wesentliche Faktoren für die CCl_4-Toxizität in Betracht.

6. Literaturverzeichnis

#1 H.J. Ahr, L.J. King, W. Nastainczyk & V. Ullrich
Biochem. Pharmacol. 29 , 2855 (1980)

#2 M.W. Anders
Trends Pharmacol. Sci. 3 , 356 (1982)

#3 G.A.S. Ansari, M.T. Moslen & E.S. Reynolds
Biochem. Pharmacol. 31 , 3509 (1982)

#4 W. Arnold
Analytische Methoden Band 2
Met-Hämoglobin (Hämiglobin)
Kommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der deutschen Forschungsgemeinschaft - Arbeitsgruppe "Analytische Chemie"
Verlag Chemie, Weinheim 1975

#5 T. Asakawa & S. Matsushita
Lipids 14 , 401 (1979)

#6 T. Asakawa & S. Matsushita
Lipids 15 , 137 (1980)

#7 B.R. Bacon, A.S. Tavill, G.M. Brittenham, C.H. Park & R.O. Recknagel
Gastroenterology 82 , 1221 (1982)

#8 G.M. Barrow
Physikalische Chemie, Teil III
Bohmann- und Vieweg Verlag, Heidelberg 1971

#9 G.R. Bartlett
J. Biol. Chem. 234 , 466 (1959)

#10 R.M. Bell & R.A. Coleman
Ann. Rev. Biochem. 49 , 459 (1980)

#11 A. Benedetti, A.F. Casini & M. Ferrali
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 17 , 519 (1977)

#12 A. Benedetti, A.F. Casini, M. Ferrali & M. Comporti
Chem. Biol. Interact. 17 , 151 (1977)

#13 A. Benedetti, A.F. Casini, M. Ferrali & M. Comporti
Experim. Molecul. Pathol. 27 , 309 (1977)

#14 A. Benedetti, M. Comporti & H. Esterbauer
Biochim. Biophys. Acta 620 , 281 (1980)

#15 K. Bergman
Scand. J. Work, Environment & Health 5 , Supplement 1 (1979)

#16 H. Beyer
Lehrbuch der organischen Chemie, 17. Auflage
S. Hirzel Verlag, Stuttgart 1973

#17 G.S. Bild, C.S. Ramadoss, S. Lim & B. Axelrod
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 , 949 (1977)

#18 H.M. Bolt, R.J. Laib & J.G. Filser
Biochem. Pharmacol. 31 , 1 (1982)

#19 H. Brockerhoff & R.G. Jensen
in "Lipolytic Enzymes" S. 194
Academic Press, New York 1974

#20 J.A. Buege & S.D. Aust
in "Methods in Enzymology" 52 , 302 (1978)

#21 T.C. Butler
J. Pharmacol. Exp. Therap. 134 , 311 (1961)

#22 F.L. Bygrave
J. Biol. Chem. 244 , 4768 (1969)

#23 J. Capdevila, N. Chacos, J. Werringloer, R.A. Prough & R.W. Estabrook
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 , 5362 (1981)

#24 J. Capdevila, L.J. Marnett, N. Chacos, R.A. Prough & R.W. Estabrook
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 , 767 (1982)

#25 J.A. Castro, E.V. Cignoli, C.R. De Castro & O.M. De Fenos
Biochem. Pharmacol. 21 , 49 (1972)

#26 N. Chacos, J.R. Falck, C. Wixtrom & J. Capdevila
Biochem. Biophys. Res. Commun. 104 , 916 (1982)

#27 J.P. Christopher, E.K. Pistorius, F.E. Regnier & B. Axelrod
Biochim. Biophys. Acta 289 , 82 (1972)

#28 D.Y. Cooper, S. Levin, S. Narasimhulu, O. Rosenthal & R.W. Estabrook
Science 147 , 400 (1965)

#29 L.K. Dahle, E.G. Hill & R.T. Holman
Arch. Biochem. Biophys. 98 , 253 (1962)

#30 M.L. Das, S. Orrenius & L. Ernster
Europ. J. Biochem. 4 , 519 (1968)

#31 H. De Groot & W. Haas
FEBS Letters 115 , 253 (1980)

#32 M.U. Dianzani & G. Ugazio
in "Biochemical mechanisms of liver injury" (Ed. T.F. Slater) S. 669
Academic Press, New York 1978

#33 M.U. Dianzani, G. Poli, E. Gravela, E. Chiarpotto & E. Albano
Lipids 16 , 823 (1981)

#34 M.I. Díaz Gómez, J.A. Castro, E.C. de Ferreyra, N. D'Acosta
& C.R. de Castro
Toxicol. Appl. Pharmacol. 25 , 534 (1973)

#35 M.I. Díaz Gómez, C.R. de Castro, N. D'Acosta, O.M. de Fenos,
E.C. de Ferreyra & J.A. Castro
Toxicol. Appl. Pharmacol. 34 , 102 (1975)

#36 C.J. Dillard & A.L. Tappel
Lipids 14 , 989 (1979)

#37 E.L. Docks & G. Krishna
Exp. Molec. Pathol. 24 , 13 (1976)

#38 H. Dürk
Diplomarbeit, Tübingen 1980

#39 E.E. Dumelin & A.L. Tappel
Lipids 12 , 894 (1977)

#40 E.G. Esaac & F. Matsumara
Pestic. Biochem. Physiol. 13 , 81 (1980)

#41 R.W. Estabrook & J. Werringloer
in "Methods in Enzymology" 52 , 212 (1978)

#42 H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, M.U. Dianzani, G. Poli & T.F. Slater
Biochem. J. 208 , 129 (1982)

#43 G. Fernández, M.C. Villarruel, E.G.D. de Toranzo & J.A. Castro
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 35 , 283 (1982)

#44 M.E. Fewster, B.J. Burns & J.F. Mead
J. Chromatog. 43 , 120 (1969)

#45 J.G. Filser, H.M. Bolt, H. Muliawan & H. Kappus
Arch. Toxicol. 52 , 135 (1983)

#46 J. Folch, I. Ascoli, M. Lees, J.A. Meath & F.N. LeBaron
J. Biol. Chem. 191 , 833 (1951)

#47 K.L. Fong, P.B. McCay, J.L. Poyer, B.B. Keele & H. Misra
J. Biol. Chem. 248 , 7792 (1973)

#48 J.W. Forstrom, F.H. Stults & A.L. Tappel
Arch. Biochem. Biophys. 193 , 51 (1979)

#49 J. Fowler
Brit. J. Pharmacol. 37 , 733 (1969)

#50 H. Frank, T. Hintze & H. Remmer
in "Applied Headspace Gas Chromatography" (Ed. B. Kolb) S. 155
Heyden, London 1980

#51 H. Frank, T. Hintze, D. Bimboes & H. Remmer
Toxicol. Appl. Pharmacol. 56 , 337 (1980)

#52 H.Frank, H.J. Haussmann & H. Remmer
Chem. Biol. Interact. 40 , 193 (1982)

#53 M.O. Funk, R. Isaac & N.A. Porter
Lipids 11 , 113 (1976)

#54 J.R. Gillette
Biochem. Pharmacol. 23 , 2785 (1974)

#55 E.A. Glende jr., A.M. Hruszkewycz & R.O. Recknagel
Biochem. Pharmacol. 25 , 2163 (1976)

#56 E. Gordis
J. Clin. Invest. 48 , 203 (1969)

#57 H. Greim, J.B. Schenkman, M. Klotzbücher & H. Remmer
Biochim. Biophys. Acta 201 , 20 (1970)

#58 F.D. Gunstone
An introduction to the chemistry and biochemistry of fatty acids and their glycerides
Chapman & Hill, London 1967

#59 A. Halbreich & J. Mager
Biochim. Biophys. Acta 187 , 584 (1969)

#60 M. Hamberg & B. Samuelsson
J. Biol. Chem. 242 , 5329 (1967)

#61 H.J. Haussmann
Diplomarbeit, Tübingen 1981

#62 D. Henschler
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 27 , 1827 (1977)

#63 P. Hochstein & L. Ernster
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12 , 388 (1963)

#64 P. Hochstein, K. Nordenbrand & L. Ernster
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14 , 323 (1964)

#65 P. Hochstein
in "Proceedings, International Conference on Hyperbaric Medicine"
(Eds. I.W. Brown & B.G. Cox) 3. Auflage S. 61
National Academy of Science, Washington DC 1966

#66 J. Högberg, A. Bergstrand & S.V. Jakobsson
Eur. J. Biochem. 37 , 51 (1973)

#67 A.M. Hruszkewycz, E.A. Glende & R.O. Recknagel
Toxicol. Appl. Pharmacol. 46 , 695 (1978)

#68 E.G. Hrycay & P.J. O'Brien
Arch. Biochem. Biophys. 147 , 14 (1971)

#69 IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk
of chemicals to humans 20 ,
Lyon 1979, S. 371

#70 H. Jaeger, H. Frank, H.U. Kloer & H. Ditschuneit
in "Applications of Glass Capillary Gas Chromatography"
(Ed. W.G. Jennings)
Chromatographic Science Series, Vol. 15, S. 395
Marcel Dekker, Inc., New York 1981

#71 E.H. Jeffery, D. Nerland, R. el-Azhary & G.J. Mannering
in "Microsomes and Drug Oxidations"
(Eds. V. Ullrich, A. Hildebrandt, I. Roots & R.W. Estabrook) S. 323
Pergamon Press, Oxford 1976

#72 E.H. Jeffery, A. Kotake, R. el-Azhary & G.J. Mannering
Mol. Pharmacol. 13 , 415 (1977)

#73 R.A. Jordan, J.B. Schenkman
Biochem. Pharmacol. 31 , 1393 (1982)

#74 JUPAC-Review
J. Am. Oil Chem. Soc. 59 , (1982)

#75 F.F. Kadlubar, K.C. Morton & D.M. Zeigler
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54 , 1255 (1973)

#76 D. Keilin & E.F. Hartree
Biochem. J. 39 , 293 (1945)

#77 M.S. Kharasch, E.V. Jensen & W.H. Urry
J. Am. Chem. Soc. 69 , 1100 (1947)

#78 H. Kieczka
Dissertationsarbeit, Tübingen 1979

#79 G.A.A. Kivits, M.A.C.R. Ganguli-Swarttouw & E.J. Christ
Biochim. Biophys. Acta 665 , 559 (1981)

#80 D.J. Kornbrust & R.D. Mavis
Mol. Pharmacol. 17 , 400 (1980)

#81 D.J. Kornbrust & R.D. Mavis
Mol. Pharmacol. 17 , 408 (1980)

#82 V.L. Kubic & M.W. Anders
Life Sci. 26 , 2151 (1980)

#83 V.L. Kubic & M.W. Anders
Chem. Biol. Interactions 34 , 201 (1981)

#84 C.S. Lai & L.H. Piette
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78 , 51 (1977)

#85 C.S. Lai & L.H. Piette
Arch. Biochem. Biophys. 190 , 27 (1978)

#86 E.J. Landon, R.K. Jaiswal & B.V. Rama Sastry
Federation Proceedings 42 , 1772 (1983)

#87 W. Levin, A.Y.H. Lu, M. Jacobson, R. Kuntzman, J.L Poyer & P.B. McCay
Arch. Biochem. Biophys. 158 , 842 (1973)

#88 M. Lieberman & I.W. Mapson
Nature 204 , 343 (1964)

#89 B. Link, H. Dürk, D. Thiel & H. Frank
Biochem. J., im Druck

#90 K. Lowrey, E.A. Glende jr. & R.O. Recknagel
Biochem. Pharmacol. 30 , 135 (1981)

#91 O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall
J. Biol: Chem. 193 , 265 (1951)

#92 H.R. Mahler & E.H. Cordes
Biological Chemistry, 2. Auflage
Harper International Edition, New York 1971

#93 Y. Masuda
Japan J. Pharmacol. 31 , 107 (1981)

#94 H.E, May & P.B. McCay
J. Biol. Chem. 243 , 2288 (1968)

#95 H.E, May & P.B. McCay
J. Biol. Chem. 243 , 2296 (1968)

#96 P.B. McCay, D.D. Gibson & K.R. Hornbrook
Federation Proc. 40 , 199 (1981)

#97 D.D. McCollister, W.H. Beamer, G.J. Atchison & H.C. Spencer
J. Pharmacol. Exp. Therap. 102 , 112 (1951)

#98 G. McConnell, D.M. Ferguson & C.R. Pearson;
Endeavour 34 , 13 (1975)

#99 J.R. Mitchell, G.B. Corcoran, C.V. Smith, H. Hughes & B.H. Lauterburg
in "Biological Reactive Intermediates" (Eds. R.Snyder, D.V. Parke,
J.J. Kocsis, D.J. Jollow, C.G. Gibson & C.M. Witmer) Vol. II, S. 199
Plenum Press, New York 1982

#100 L. Moore, T. Chen, H.R. Knapp & E.G. Landon
J. Biol. Chem. 250 , 4562 (1975)

#101 L. Moore, G.R. Davenport & E.J. Landon
J. Biol. Chem. 251 , 1197 (1976)

#102 O.J. Morré, J. Kartenbeck & W.W. Franke
Biochim. Biophys. Acta 559 , 71 (1979)

#103 M. Nakano, T. Noguchi, K. Sugioka, H. Fukuyama, M. Sato, Y. Shimizu,
Y. Tsuji & H. Inaba
J. Biol. Chem. 250 , 2404 (1962)

#104 T. Nash
Biochem. J. 55 , 416 (1953)

#105 W. Nastainczyk, V. Ullrich & H. Sies
Biochem. Pharmacol. 27 , 387 (1978)

#106 W. Nastainczyk, H.J. Ahr & V. Ullrich
Biochem. Pharmacol. 31 , 391 (1982)

#107 G.J. Nelson
in "Analysis of lipids and lipoproteins" (Ed. E.G. Perkins) S. 1
American Oil Chemists' Society, Champaign (Illinois) 1975

#108 H. Nishibayashi & R. Sato
J. Biochem. Tokyo 61 ; 491 (1967)

#109 P.J. O'Brien
Canad. J. Biochem. 47 , 485 (1969)

#110 P.J. O'Brien & C. Little
Canad. J. Biochem. 47 , 493 (1969)

#111 P.J. O'Brien & A. Rahimtula
J. Agr. Food Chem. 23 , 154 (1975)

#112 "Organikum" (Autorenkollektiv) 10. Auflage S. 713
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (DDR) 1971

#113 T. Omura & R. Sato
J. Biol. Chem. 239 , 2370 (1964)

#114 T. Omura & R. Sato
J. Biol. Chem. 239 , 2379 (1964)

#115 T.C. Pederson, J.A. Buege & S.D. Aust
J. Biol. Chem. 248 , 7134 (1973)

#116 T.C. Pederson & S.D. Aust
Biochim. Biophys. Acta 385 , 232 (1975)

#117 S.D. Pencil, E.A. Glende jr. & R.O. Recknagel
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 36 , 413 (1982)

#118 C.L. Penney
Anal. Biochem. 75 , 201 (1976)

#119 D. Pessayre & P. Mazel
Biochem. Pharmacol. 25 , 943 (1976)

#120 D. Pessayre, P. Mazel, V. Descatoire, E. Rogier & G. Feldmann
Xenobiotica 9 , 301 (1979)

#121 P.M. Pfeifer & P.B. McCay
J. Biol. Chem. 246 , 6401 (1971)

#122 G.L. Plaa & H.P. Witschi
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16 , 125 (1976)

#123 L.R. Pohl, B. Bhooshan, N.F. Whittacker & G. Krishna
Biochem. Biophys. Res. Commun. 79 , 648 (1977)

#124 L.R. Pohl, R.V. Branchflower, R.J. Highet, J.L. Martin, D.S. Nunn, T.J. Monks, J.W. George & J.A. Hinson
Drug Metab. Disposition 9 , 334 (1981)

#125 C.F. Poole
HRC & CC 5 , 454 (1982)

#126 J.L. Poyer, P.B. McCay, E.K. Lai, E.G. Janzen & E.R. Davis
Biochem. Biophys. Res. Commun. 94 , 1154 (1980)

#127 J.L. Poyer, P.B. McCay, C.C. Weddle & P.E. Downs
Biochem. Pharmacol. 30 , 1517 (1981)

#128 B. Preiss & K. Block
J. Biol. Chem. 239 , 85 (1964)

#129 O.S. Privett, C. Nickell & W.O. Lundberg
J. Amer. Oil Chem. Soc. 32 , 505 (1955)

#130 H.J. Raitel
in "Toxische Leberschäden" S. 45
27. Ärztliches Seminar in Föhrenkamp und Hellbachtal,
Kliniken der Bundesversicherungsanstalt für Angestellte in Mölln;
Falk-Foundation e.V., Freiburg i.Br. 1982

#131 K.S. Rao & R.O. Recknagel
Exp. Mol. Pathol. 10 , 219 (1969)

#132 R.O. Recknagel & A.K. Ghoshal
Laboratory Investigation 15 , 132 (1966)

#133 R.O. Recknagel
Pharmacol. Rev. 19 , 145 (1967)

#134 R.O. Recknagel, E.A. Glende jr. & A.M. Hruszkewycz
in "Free Radicals in Biology" (Ed. W.A. Pryor) Vol. III, S. 97
Academic Press, New York 1977

#135 R.O. Recknagel
Trends Pharmacol. Sci. 4 , 129 (1983)

#136 R.O. Recknagel
Life Sci. 33 , 401 (1983)

#137 O. Reiner & H. Uehleke
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 , 1048 (1971)

#138 O. Reiner, S. Åthanassopoulos, K.H. Hellmer, R.E. Murray & H. Uehleke
Arch. Toxicol. 29 , 219 (1972)

#139 H. Remmer, H. Greim, J.B. Schenkman & R.W. Estabrook
in "Methods in Enzymology" 10 , 703 (1967)

#140 E.S. Reynolds
J. Pharmacol. Exp. Ther. 155 , 117 (1967)

#141 E.S. Reynolds, M.T. Moslen & R.J. Treinen
in "Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology"
(Eds. M.A.J. Rodgers & E.L. Powers) S. 169
Academic Press, New York 1981

#142 C.A. Riely, G. Cohen & M. Lieberman
Science 183 , 208 (1974)

#143 M.K. Roders, E.A. Glende & R.O. Recknagel
Science 196 , 1221 (1977)

#144 M.K. Roders, E.A. Glende & R.O. Recknagel
Biochem. Pharmacol. 27 , 437 (1978)

#145 G. Rouser, G. Kritchevsky & A. Yamamoto
in "Lipid Chromatographic Analysis" (Ed. G.V. Marinetti) Vol. 3,
S. 713
Marcel Dekker, Inc., New York 1976

#146 D. Rubinstein & L. Kanics
Canad. J. Biochem. 42 , 1577 (1964)

#147 M. Sagai & A.L. Tappel
Toxicol. Appl. Pharmacol. 49 , 283 (1979)

#148 L.J. Sannes & E.D. Hultquist
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91 , 1309 (1979)

#149 F.A.X. Schanne, A.B. Kane, E.E. Young & J.L. Farber
Science 206 , 700 (1979)

#150 G. Schmalzing, E. Pfaff & U. Breyer-Pfaff
Life Sci. 29 , 371 (1981)

#151 R.M. Schulze & H. Kappus
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 27 , 129 (1980)

#152 R.M. Schulze
Dissertationsarbeit, Düsseldorf 1981

#153 A.A. Seawright & A.E.M. McLean
Biochem. J. 105 , 1967

#154 J. Seelig & W. Hasselbach
Eur. J. Biochem. 21 , 17 (1971)

#155 I.H. Segel
Biochemical Calculations (second Edition)
John Wiley & Sons, Inc., New York 1976

#156 A. Sevanian, R.A. Stein & J. Mead
Lipids 16 , 781 (1981)

#157 H. Shimasaki & O.S. Privett
Arch. Biochem. Biophys. 169 , 506 (1975)

#158 T.F. Slater & B.C. Sawyer
Biochem. J. 123 , 823 (1971)

#159 T.F. Slater
in "Biochemical Mechanisms of Liver Injury" (Ed. T.F. Slater) S. 745
Academic Press, London 1978

#160 W.L. Smith & W.E.M. Lands
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41 , 846 (1970)

#161 W.L. Smith & W.E.M. Lands
J. Biol. Chem 247 , 1038 (1972)

#162 N.H. Stacey & B.G. Priestly
Toxicol. Appl. Pharmacol. 45 , 41 (1978)

#163 M. Strecker
Diplomarbeit, Tübingen 1979

#164 O. Strubelt & H. Breining
Toxicol. Letters 6 , 109 (1980)

#165 R.A. Sunde & W.G. Hoekstra
Nutrition Reviews 38 , 265 (1980)

#166 B.A. Svingen, J.A. Buege, F.O. O'Neal & S.D. Aust
J. Biol. Chem. 254 , 5892 (1979)

#167 B.K. Tam & P.B. McCay
J. Biol. Chem. 245 , 2295 (1970)

#168 J. Terao & S. Matsushita
Lipids 16 , 98 (1981)

#169 R. The & W. Hasselbach
Eur. J. Biochem. 39 , 63 (1973)

#170 M. Tien, B.A. Svingen & S.D. Aust
Federation Proc. 40 , 179 (1981)

#171 J.C. Touchstone, J.C. Chen & K.M. Beaver
Lipids 15 , 61 (1980)

#172 J.P. Tracey & P. Sherlock
N Y State J. Med. 68 , 2202 (1968)

#173 J.R. Trudell, B. Bösterling & A.J. Trevor
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 , 2678 (1982)

#174 J.R. Trudell, B. Bösterling & A.J. Trevor
Molec. Pharmacol. 21 , 710 (1982)

#175 H. Uehleke, K.H. Hellmer & S. Tabarelli
Xenobiotica 3 , 1 (1973)

#176 H. Uehleke & Th. Werner
Arch. Toxicol. 34 , 289 (1975)

#177 G. Ugazio, M.V. Torrielli, E. Burdino, B.C. Sawyer & T.F. Slater
Biochem. Soc. Trans. 4 , 353 (1976)

#178 H. van den Bosch
Annual Reviews of Biochemistry 43 , 243 (1974)

#179 H. van den Bosch
Biochim. Biophys. Acta 604 , 191 (1980)

#180 L.M.C. van Golde, J. Raben, J.J. Batenburg, B. Fleischer, F. Zambrano & S. Fleischer
Biochim. Biophys. Acta 360 , 179 (1974)

#181 H.M. Verheij, A.J. Slotboom & G.H. de Haas
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 91 , 91 (1981)

#182 M.C. Villarruel, M.I. Díaz Gómez & J.A. Castro
Toxicol. Appl. Pharmacol. 33 , 106 (1975)

#183 C.H. Walker
Life Sci. 8 , 1111 (1969)

#184 R.L. Waller, E.A. Glende jr. & R.O. Recknagel
Biochem. Pharmacol. 32 , 1613 (1983)

#185 M.R. Waterman
in "Methods in Enzymology" 52 , 456 (1978)

#186 J.T. Watson
Introduction to Mass Spectrometry
Raven Press, New York 1976

#187 J. Werringloer
in "Methods in Enzymology" 52 , 297 (1978)

#188 R.E. White & M.J. Coon
Ann. Rev. Biochem. 49 , 315 (1980)

#189 M. Wiegand
Diplomarbeit, Tübingen 1982

#190 K.M. Wilbur, F. Bernheim & D.W. Shapiro
Arch. Biochem. Biophys. 24 (1949)

#191 R.J. Willis, M. Pesh-Imam & R.O. Recknagel
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 18 , 433 (1977)

#192 R.J. Willis
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 61 , 139 (1983)

#193 E.D. Wills
Biochim. Biophys. Acta 84 , 475 (1964)

#194 E.D. Wills
Biochem. J. 113 , 315 (1969)

#195 E.D. Wills
Biochem. J. 113 , 325 (1969)

#196 E.D. Wills
Biochem. J. 123 , 983 (1971)

#197 C.R. Wolf, D. Mansuy, W. Nastainczyk & V. Ullrich
in "Microsomes and Drug Oxidations"
(Eds. V. Ullrich, A. Hildebrandt, I. Roots & R.W. Estabrook) S. 240
Pergamon Press, Oxford 1976

#198 C.R. Wolf, W.G. Harrelson jr., W.M. Nastainczyk, R.M. Philpot, B. Kalyanaraman & R.P. Mason
Molecular Pharmacol. 18 , 553 (1980)

#199 Y. Yamazoe, M. Sugiura, T. Kamataki & R. Kato
Japan J. Pharmacol. 29 , 715 (1979)

#200 H. Yoshida & J.C. Alexander
Lipids 18 , 402 (1983)

#201 H. Yoshida & J.C. Alexander
Lipids 18 , 611 (1983)

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Dozenten:

Anatomie: K. Mörike
Anorganische Chemie: E. Wiberg
Botanik: Frau Grahle, H. Metzner
Genetik: W. Seyffert
Mathamatik: W. Schweizer, Seebach
Mikrobiologie: H. Zähner
Molekularbiologie: P.H. Hofschneider, W. Zillig, H. Probst
Organische Chemie: E. Bayer, E. Müller
Pharmakologie und Toxikologie: H.M. Bolt, H. Remmer
Physik: H. Krüger
Physikalische Chemie: H. Mauser
Physiologie: E. Betz, R. Jacob
Physiologische Chemie und Biochemie: T. Bücher, K. Klingenberg, F. Lynen, D. Mecke, G. Weizel
Radioisotopenkurs: U. Feine, E. Kallee
Zoologie: K.G. Grell

Lebenslauf

Am 26. Juni 1948 wurde ich, Bernhard Link, als Sohn von Dorothea Link, geb. Schmid, und Ernst Link in Nagold geboren. Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Nagold, anschließend trat ich in das Gymnasium Nagold über, wo ich im Sommer 1967 die Reifeprüfung bestand. Im Wintersemester 1967/68 immatrikulierte ich mich in der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität in München, zum Sommersemester 1968 wechselte ich zum Fach Biochemie an die Universität Tübingen. Vom Frühjahr 1973 bis Herbst 1974 unterbrach ich das Biochemiestudium, um in einem biochemischen Labor an der Universitätsklinik in Freiburg i. Br. den zivilen Ersatzdienst abzuleisten. Im Rahmen des Biochemiestudiums war ich vom Sommersemester 1976 an ein Jahr an der Ludwig-Maximilian-Universität in München eingeschrieben, wobei ich in verschiedenen Arbeitsgruppen des Biochemischen Instituts der Universität und des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried mitarbeiten konnte. Nach der mündlichen Diplomhauptprüfung im Sommer 1978 fertigte ich am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H.M. Bolt meine Diplomarbeit über den "Metabolismus von Perchloräthylen in vivo und in vitro" an. Nach Erhalt des Diploms als Biochemiker im September 1979 begann ich am gleichen Institut unter der Leitung von Prof. Dr. H. Remmer in der Arbeitsgruppe von Dr. H. Frank mit den Experimenten zu der hier vorliegenden Doktorarbeit mit dem Thema "In-vitro-Untersuchungen zum Mechanismus der durch Tetrachlormethan ausgelösten Leberschädigung". Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im November 1983 abgeschlossen.
Seit 1979 bin ich mit der Krankengymnastin Johanna Link, geb. Foos, verheiratet. Am 19. Oktober 1979 kam unsere Tochter Sarah Elena und am 27. Juli 1982 unsere Tochter Katrin zur Welt.